

CHEMISCHE UND PHARMAKOLOGISCHE UNTERSUCHUNGEN
VON SPIGELIA ANTHELMIA L. UND
FUNTUMIA AFRICANA (BENTH.) STAPF

KARIN SEEGERT

*Des
München
1905*



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Chemische und pharmakologische Untersuchungen
von *Spigelia anthelmia* L. und
Funtumia africana (Benth.) Stapf

Dissertation
der
Fakultät für Chemie und Pharmazie
der
Ludwig-Maximilians-Universität
München

vorgelegt
von
Karin Seegert
aus
Illertissen

September 1985

1. Berichterstatter: Professor Dr. H. W a g n e r
 2. Berichterstatter: Professor Dr. E. R e i m a n n
- Tag der mündlichen Prüfung: 21. November 1985

I N H A L T S V E R Z E I C H N I S

	Seite
E I N L E I T U N G	1
A L L G E M E I N E R T E I L	2
Teil I: Spigelia anthelmia L.	2
1. Kenntnisstand über Spigelia anthelmia . .	2
1.1. Vorkommen und botanische Beschreibung . .	2
1.2. Bisherige chemische Untersuchungen . . .	4
1.3. Volksmedizinische Verwendung	4
1.4. Spigelia in der Homöopathie	5
2. Orientierende Untersuchungen	6
2.1. Prüfung auf Herzglykoside	6
2.2. Prüfung auf Flavonoide und Phenolcarbon- säuren	7
2.3. Prüfung auf Alkaloide	7
3. Untersuchung der lipophilen Alkaloide . .	8
3.1. Extraktionsverfahren	8
3.1.1. Soxhlet-Extraktion	8
3.1.2. Perkolation	8
3.1.3. Wasserdampfdestillation	9
3.1.4. Beurteilung der Extraktionsverfahren . . .	9
3.2. Isolierung von SA 1 und SA 2	12
3.3. Identifizierung von Substanz SA 1	14
3.4. Charakterisierung von Verbindung SA 2 . .	17
3.4.1. GC/MS-Analyse	17
3.4.2. Festlegung von Strukturelementen	18
4. Untersuchung der quartären Alkaloide . . .	22
4.1. Extraktion	22
4.2. Reinigung	22
4.3. Identifizierung von Cholin	25
4.4. Cholinester	26
4.4.1. Hydrolysen	26
4.4.2. Nachweis von Cholin	26

	Seite
4.4.3. Identifizierung der Säuren	28
4.4.4. DC-Vergleich mit synthetischen Verbindungen	31
4.4.5. Quantitative Bestimmung der Ester	33
4.5. Vorkommen von Cholinestern in Pflanzen . .	34
5. Flavonoide und Phenolcarbonsäuren	36
5.1. Extraktbereitung	36
5.2. Phenolcarbonsäuren	36
5.3. Flavonoide	38
5.3.1. Dünnschichtchromatographie	38
5.3.2. Hydrolysen	39
5.4. HPLC-Untersuchung	41
6. Vergleichende dünnschichtchromatographische Untersuchungen	43
7. Pharmakologische Untersuchungen	44
8. Zusammenfassung der in Teil I (<i>Spigelia</i> <i>anthelmia</i> L.) erhaltenen Ergebnisse . . .	47
<u>Teil II:</u> <i>Funtumia africana</i> (Benth.) Stapf	48
1. Kenntnisstand über <i>Funtumia africana</i> . . .	48
1.1. Systematik und Vorkommen	48
1.2. Botanische Beschreibung	48
1.3. Bisherige Untersuchungen	50
1.4. Volksmedizin und Pharmakologie	52
2. Voruntersuchungen	53
2.1. Alkaloid-Screening	53
2.2. Vergleichende DC-Untersuchung	53
3. Isolierung	57
3.1. Extraktbereitung	57
3.2. Anreicherungsverfahren	57
3.3. Präparative DC	57
3.4. Analytische HPLC	57
3.5. Präparative HPLC	59
4. Orientierende dünnschichtchromatographische Untersuchungen zur Strukturaufklärung . .	60

	Seite
5. Strukturaufklärung von Verbindung FAN 1/1	63
5.1. UV- und IR-Spektren	63
5.2. Massenspektrometrie	64
5.3. ^1H -NMR-Spektroskopie	67
5.4. Bestimmung von Lage und Konfiguration der OH-Gruppe	69
5.4.1. ^1H -NMR-Spektrum von FAN 1/1 in CDCl_3 . . .	70
5.4.2. ^1H -NMR-Spektrum von FAN 1/1 in DMSO-d_6 . .	70
5.4.3. Vergleich der ^1H -NMR-Resonanzlagen für CH_3 und CH-OH mit Literaturwerten	72
5.5. Darstellung des FAN 1/1-Diacetates	74
6. Strukturaufklärung von Verbindung FAN 1/2	75
6.1. Bewertung von IR, MS und UV	75
6.2. ^1H -NMR-Spektrum von FAN 1/2	77
7. Strukturaufklärung von Verbindung FAN 2 .	82
7.1. Festlegung des Grundgerüsts	82
7.2. Bestimmung von Position und Konfiguration der Hydroxylgruppen	84
7.3. Darstellung eines Acetonids von FAN 2 . .	87
7.4. Bestimmung der Konfiguration an C-20 für Verbindung FAN 2	88
7.5. Untersuchung weiterer Resonanzlagen auf- grund des 2D-Spektrums	94
8. Bestimmung des Circular dichroismus (CD) .	95
8.1. CD bekannter Verbindungen	95
8.2. CD der Funtumia-Alkaloide	97
9. HPLC-Untersuchungen	99
9.1. Vergleichende HPLC von Funtumia- und Holarrhena-Rohalkaloidextrakten	99
9.2. Quantitative Bestimmung der Hauptalkaloide in Funtumia africana	102
10. Pharmakologische Untersuchungen	103
11. Zusammenfassung der in Teil II (Funtumia africana (Benth.) Stapf) erhaltenen Ergebnisse	105

	Seite
ZUSAMMENFASSUNG	106
EXPERIMENTELLER TEIL	109
I. Herkunft des Drogenmaterials	109
II. Herkunft der Vergleichssubstanzen	110
III. Allgemeine Arbeitsmethoden	110
1. Fällungsreagenzien für Alkaloide	110
2. Dünnschichtchromatographie	111
2.1. Adsorbentien	111
2.2. Laufmittelsysteme	112
2.3. Detektion	113
3. HPLC	115
3.1. Apparative Daten	115
3.2. Lösungsmittel	115
3.3. Einspritzmenge	115
3.4. Trennsysteme für die analytische HPLC (TS)	116
3.5. Trennsysteme für die präparative HPLC (PTS)	117
4. Gaschromatographie	118
4.1. Apparative Daten	118
4.2. Trennsysteme (GC-TS)	118
5. Physikalisch-chemische Untersuchungen	119
IV. Spezielle Arbeitsmethoden	121
1. Spigelia anthelmia (Kraut)	121
1.1. Inhaltsstoff-Screening	121
1.2. Flüchtige Alkaloide	121
1.2.1. Extraktion	121
1.2.2. Isolierung der Substanzen SA 1 und SA 2 durch präparative HPLC	122
1.2.3. Anreicherung von Secologanin	122
1.2.3. Physikalische Daten	123
1.3. Quartäre Alkaloide	123
1.3.1. Extraktion	123
1.3.2. Reinigung	124
1.3.3. Präparative DC	124
1.3.4. Hydrolyse	125

	Seite
1.3.5. Herstellung der BSTFA-Verbindungen	125
1.3.6. Physikalische Daten	125
1.4. Flavonoide und Phenolcarbonsäuren	126
1.4.1. Extraktion und Anreicherung	126
1.4.2. Hydrolysen	126
2. <i>Spigelia anthelmia</i> (Samen)	127
3. <i>Spigelia humboldtiana</i> (Kraut)	127
4. <i>Valeriana officinalis</i>	127
5. Synthesen	128
5.1. 1-Methyl-1,2,3,4-tetrahydroisochinolin . .	128
5.2. 1,2-Dimethylindolin	129
5.3. 3,3-Dimethylacryloylcholin	129
6. <i>Funtumia africana</i> (Rinde)	130
6.1. Herstellung der Rohalkaloidfraktion F _G . .	130
6.2. Säulenchromatographie	131
6.3. Isolierung der Alkaloide FAN 1 und FAN 2 durch präparative DC	131
6.4. HPLC-Fraktionierung des Alkaloids FAN 1 .	132
6.5. Darstellung eines Dihydrochinazoliniums- salzes des Alkaloidgemisches FAN 1	132
6.6. Darstellung des Diacetates von Alkaloid FAN 1/1	133
6.7. Darstellung des Acetonids von Alkaloid FAN 2	133
6.8. Physikalische Daten	134
7. <i>Funtumia africana</i> (Blätter)	137
8. <i>Holarrhena antidysenterica</i> (Rinde)	137
V. Pharmakologische Untersuchungen	138
1. Prüfung auf Herzwirksamkeit am isolierten Meerschweinchenvorhof	138
2. In vivo Bestimmung der Herzfrequenz und des peripheren Blutdrucks an Ratte und Meer- schweinchen	138
L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S	139

E I N L E I T U N G

Von den nicht steroidhaltigen herzwirksamen Drogen hat neben Crataegus und Cactus die aus Südamerika stammende Spigelia antheimia L. große volksmedizinische Bedeutung. Extrakte aus der Spigelia-Droge sind Bestandteile zahlreicher, auch bei uns zur Herztherapie eingesetzter Präparate.

Für die in Zentral- und Westafrika beheimatete Funtumia africana (Benth.) Stapf existieren keine Angaben über die Verwendung als Herz- und Kreislauftherapeutikum. Doch ließ die enge Verwandtschaft dieser Pflanze mit Holarrhena antidysenterica, einer volksmedizinisch bedeutsamen herzaktiven Droge, auch hier ähnliche Wirkungen vermuten.

Über die chemische Zusammensetzung und Pharmakologie beider Drogen ist so gut wie nichts bekannt. Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Drogen phytochemisch zu untersuchen, d.h. die Hauptverbindungen zu isolieren, in ihrer Struktur aufzuklären und sie abschließend pharmakologisch auf mögliche Herz- und Kreislaufwirkungen zu prüfen. Mit den Untersuchungen sollte ein Beitrag zur Chemie und Pharmakologie nicht herzglykosidhaltiger, therapeutisch bedeutender Drogen geleistet werden.

A L L G E M E I N E R T E I L

Teil I: *Spigelia anthelmia* L.

1. Kenntnisstand über *Spigelia anthelmia*

1.1. Vorkommen und botanische Beschreibung

Die Gattung *Spigelia*, von der über dreißig verschiedene Arten existieren, gehört zur Familie der Loganiaceae. Die wichtigsten Arten sind die in den USA heimische *Spigelia marylandica* L., die im Amerikanischen Arzneibuch USP IX offizinell war (1) und *Spigelia anthelmia* L., die in Westindien und im tropischen Amerika vorkommt (2). *Spigelia humboldtiana* Champ.& Schlecht. stellt eine weitere süd-amerikanische *Spigelia*-Art dar.

Spigelia anthelmia, auch Wurmkraut genannt, ist eine einjährige Pflanze von 15 cm bis zu 1.30 m Höhe. Die Wurzeln sind schwärzlich und bestehen aus vielen dünnen Fasern. Die etwa 10 cm großen Blätter sind länglich, eiförmig, fiedernervig und sehr kurz gestielt. Die unteren Blätter stehen gegenständig, die oberen vierwirtelig am hohlen, vierkantigen Stengel. Die kleinen, rötlichen Blüten sind in endständigen Blütenständen vereinigt. Die Kelchblätter sind klein, schmal-lanzettlich und nur im Grunde verwachsen. Die fünf rötlich bis violetten Blütenblätter bilden eine glockige, fünflappige Röhre. Die Frucht ist eine wenigsamige Kapsel (3,4,5).



A: Ganzpflanze

C: Kapsel

B: Blüte

D: Samen

Abb. 1:

SPIGELIA ANTHELMIA L.

Habituszeichnung aus "Tomado de Annals of the Missouri
Botanical Garden" 54, 395 (1967)

1.2. Bisherige chemische Untersuchungen

Es liegen nur wenige Arbeiten über *Spigelia anthelmia* vor. So isolierte BOORSMA (6) eine sehr toxische, nicht flüchtige Base, die er Spigeli(i)n nannte. Andere Autoren (7, 8) charakterisieren Spigelin als flüchtige, amorphe und äußerst giftige Base. Laut HEGNAUER (9) soll es sich hierbei um eine Verwechslung mit der von DUDLEY (10) 1881 erstmals untersuchten *Spigelia marylandica* handeln. Eine nähere Beschreibung des Alkaloids erfolgte in beiden Fällen nicht.

Daneben wies BOORSMA in den Samen von *Spigelia anthelmia* gerbstoffartige Verbindungen und 30% fettes Öl nach (6). McINTYRE (11) konnte kein Alkaloid isolieren, fand dafür aber einen nicht näher charakterisierten Bitterstoff.

1.3. Volksmedizinische Verwendung

In ihrem Herkunftsland, dem tropischen Amerika, wird die getrocknete Ganzpflanze als Anthelminthicum gebraucht (12). Verwendung finden sowohl Infuse und Dekokte der Ganzpflanze als auch die Wurzeln (13). Eine Studie von SIEVERS (14) belegt die insektizide Wirkung von *Spigelia*. Die frische Pflanze gilt als sehr giftig. Sie verursacht, in größeren Mengen genossen, Vomitus, dilatierte Pupillen, Dyspnoe und Krämpfe (3). Die Neger benutzen die frische Droge, deren Ausdünstungen schon für schädlich gehalten werden, um aus Rachsucht Tiere oder Menschen zu vergiften (8). Dem widerspricht eine Studie von JOHNSON (15), der durch Fütterungsversuche an Kaninchen feststellte, daß nur die Samen toxisch sind.

1.4. Spigelia in der Homöopathie

HAHNEMANN (16) führte Spigelia 1819 in die Homöopathie ein. Sie ist im Homöopathischen Arzneibuch der USA von 1941 (17) und im HAB 1934 (18) enthalten. Im 3. Nachtrag 1985 zum gültigen Homöopathischen Arzneibuch (19) wurde die Spigelia, die bis dahin nicht mehr offizinell war, wieder aufgenommen. Das HAB läßt zur Bereitung der Urtinktur die getrockneten oberirdischen Teile verwenden (Vorschrift 4a).

Als hauptsächliche Indikationen für Spigelia gelten Erkrankungen des Herzens (20,21,22). Spigelia wird verwendet bei Herzschmerzen und -stichen, ferner bei Angina pectoris und Tachykardien, die oft von Extrasystolen begleitet sind. Bei entzündlichen Prozessen wie Perikarditis und Endokarditis wurden gute Erfolge erzielt. Sehr gut sollen Nervenschmerzen jeder Art auf Spigelia ansprechen. Sie ist ein erprobtes Mittel bei Ziliar- und Trigeminusneuralgie, bei Migräne und heftigen Kopfschmerzen. Üblicherweise werden zur Therapie Verdünnungen von D2 bis D6 eingesetzt (24). In selteneren Fällen wird die Droge bei Augenleiden, Stirnhöhlenkatarrh, Husten, Atemnot, Gicht (3), Fieber und Helminthiasis (22) angewendet.

2. Orientierende Untersuchungen

Für Voruntersuchungen standen uns 450 g Drogenmaterial zur Verfügung. Da in der Literatur stickstoffhaltige Verbindungen in *Spigelia anthelmia* beschrieben werden und in der Homöopathie die Herzwirksamkeit der Droge im Vordergrund steht, prüften wir zunächst auf eventuelle Anwesenheit von Alkaloiden, Herzglykosiden und Flavonoiden. Flavonoide wurden in das Screening miteinbezogen, weil nach BÖHM (25) einigen Flavonoiden, z.B. Quercetin, eine cardiotone Wirkung zukommen soll. Für die Vorproben diente ein durch Soxhletextraktion gewonnener Methanolextrakt, der zur Trockene eingeeengt wurde.

2.1. Prüfung auf Herzglykoside

Die Prüfung auf Herzglykoside erfolgte in Anlehnung an eine allgemeine, zur Anreicherung von Herzglykosiden häufig verwendete Vorschrift (26). Der eingeeengte Methanolextrakt wurde in Ethanol gelöst und mehrmals mit Petrolether ausgeschüttelt. Nach Zugabe von Wasser wurde mehrfach mit Chloroform unterschichtet. Die vereinigten Unterphasen engten wir nach Trocknen über Na_2SO_4 ein und chromatographierten im Laufmittel $\text{EtOAc}:\text{MeOH}:\text{H}_2\text{O}$ 100:13.5:10. Es zeigten sich weder beim Besprühen mit Kedde Reagenz (27), noch bei Detektion mit Antimon-(III)-chlorid in Chloroform (Carr-Price Reagenz (28)) die für Herzglykoside typischen Färbungen.

2.2. Prüfung auf Flavonoide und Phenolcarbonsäuren

Zur Prüfung auf Flavonoide und Phenolcarbonsäuren wurden eine Ethylacetat- und Butanolausschüttelung des in Wasser aufgenommenen Methanolextraktes hergestellt. Die Dünnschichtchromatographie im Laufmittelsystem EtOAc:AcOH:HCOOH:H₂O 100:11:11:26 zeigte, daß sich die Hauptmenge der Flavonoide in der Butanolfraktion befand. Daneben war noch Chlorogensäure nachweisbar. In der Ethylacetatfraktion waren weitere, zum Teil im UV 366 blau-grün fluoreszierende Verbindungen, vermutlich Phenolcarbonsäuren, vorhanden (vgl. 5.).

2.3. Prüfung auf Alkaloide

Das Alkaloid-Screening wurde durch kombinierte Anwendung von chemischen und dünn-schichtchromatographischen Methoden nach einer Vorschrift von BRÜNING (29) durchgeführt. Eine salzsaure Lösung des Methanolextraktes zeigte positive Reaktion mit den Fällungsreagenzien nach VALSER (30) und MAYER (31). Da jedoch auch positive Ergebnisse vor allem durch Proteine vorgetäuscht werden können (32), wurde eine Anreicherung vorgenommen. Wir entfernten saure und neutrale lipophile Bestandteile durch mehrmaliges Schütteln mit Dichlormethan aus dem salzsauren Methanolextrakt. Anschließend wurde mit 10% iger wässriger Na₂CO₃-Lösung alkalisiert und durch erneutes Ausschütteln mit Dichlormethan die Alkaloidfraktion gewonnen. Die eingeeengte Dichlormethanphase wurde im System CHCl₃:MeOH 95:5 chromatographiert. Die Platte besprühten wir mit Dragendorff Reagenz (33) und anschließend zur Farbtintensivierung mit 10% iger NaNO₂-Lösung. Der Rest wurde mit 1% iger HCl versetzt, kräftig geschüttelt und zentrifugiert. Die überstehende saure Phase testeten wir mit VALSERS und MAYERS Reagenz, wobei eine 0.01% ige Strychninlösung als Vergleich diente. Sowohl die DC-Untersuchung als auch die Fällungsreaktionen fielen positiv aus.

Zur Prüfung auf quartäre Verbindungen wurde die alkalisch-wässrige Phase der Ausschüttelung neutralisiert und zur Trockene eingedunstet. Der Rückstand wurde in Wasser aufgenommen und angesäuert. Auf Zugabe einer gesättigten wässrigen Reinecke-Salz-Lösung entstand ein rötlicher Niederschlag.

Das Screening ergab somit, daß neben lipophilen Alkaloiden auch wasserlösliche quartäre Stickstoffverbindungen in *Spigelia anthelmia* vorhanden sein sollten.

3. Untersuchung der lipophilen Alkaloide

3.1. Extraktionsverfahren

Im Screening-Verfahren hatte sich bereits gezeigt, daß *Spigelia anthelmia* nur einen geringen Alkaloidgehalt besitzt. Es mußte daher ein geeignetes Extraktionsverfahren gefunden werden, das die Inhaltsstoffe möglichst quantitativ erfaßte. Wir erprobten mehrere Methoden.

3.1.1. Soxhlet-Extraktion

Die gepulverte Droge wurde mit Methanol am Soxhlet extrahiert. Den Methanolextrakt engten wir am Rotavapor zur Trockene ein und versetzten mehrmals mit 1% iger HCl. Lipophile saure und neutrale Bestandteile wurden mit Dichlormethan abgetrennt. Nach Alkalisieren der wässrigen Lösung mit 10% iger Ammoniaklösung und Ausschütteln mit Dichlormethan erhielten wir die Rohalkaloidfraktion.

3.1.2. Perkolation

Die gepulverte Droge wurde 24 Stunden mit Ethanol mazeriert und anschließend in einen Perkolationstrichter gefüllt. Die Perkolation erstreckte sich über mehrere Tage,

bis der Ablauf farblos war. Die gesammelten, eingeeengten Ethanolauzüge wurden mit Salzsäure versetzt. Die weitere Aufarbeitung erfolgte wie unter 3.1.1. beschrieben.

3.1.3. Wasserdampfdestillation

Da die Literatur Hinweise auf die Flüchtigkeit der Alkaloide gab, unterzogen wir die Droge einer Wasserdampfdestillation.

Das gemahlene Herbamaterial wurde mit 10% iger Na_2CO_3 -Lösung durchfeuchtet, in Wasser suspendiert und destilliert. Das Destillat fingen wir in einer eisgekühlten, verdünnten Salzsäurelösung auf. Nach Beendigung der Destillation wurden die flüchtigen terpenoiden Verbindungen durch Ausschütteln mit Petrolether und Ether entfernt. Dann wurde die Alkaloidfraktion durch Alkalisieren mit 10% igem Ammoniak und mehrmaligem Ausschütteln mit Ether aus der wässrigen Phase abgetrennt. Die vereinigten Etherphasen wurden über Na_2SO_4 getrocknet und bei einer Temperatur unter 30°C zur Trockene eingeeengt. Auf diese Weise erhielten wir die Rohalkaloidfraktion DSA.

3.1.4. Beurteilung der Extraktionsverfahren

Wie die vergleichende DC und die Rückstandsmengen ergaben, war durch Aufarbeitung nach Schema 3.1.2. die geringste Ausbeute an Alkaloiden zu erzielen. Die Methoden 3.1.1. und 3.1.3. zeigten, was die Menge der Hauptalkaloide betraf, kaum Unterschiede. Durch das Destillationsverfahren konnten jedoch die Hauptverbindungen weitgehend frei von weiteren Drogeninhaltsstoffen gewonnen werden. Außerdem erlaubte diese Methode eine schnelle Aufarbeitung auch größerer Drogenmengen. Aus diesen Gründen wurde im weiteren für die Gewinnung der Alkaloidfraktion das Verfahren 3.1.3. gewählt.

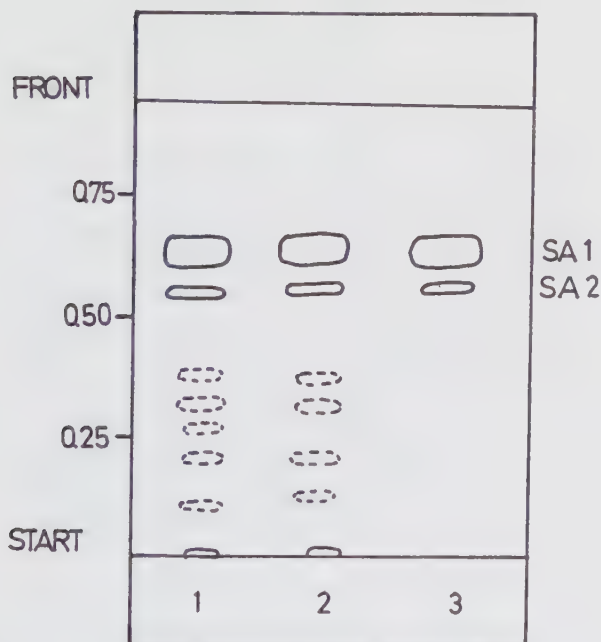
Die nachfolgende Tabelle zeigt die unterschiedlichen Ausbeuten.

Tabelle 1: Ausbeute an Alkaloidrohfraktion

Methode	Ausbeute (mg)	Ausbeute (%)
Soxhlet 3.1.1.	500	0.01
Perkolation 3.1.2.	100	0.002
Destillation 3.1.3.	40	0.008

Die Angaben beziehen sich auf die aus jeweils 500 g Droge erhaltene Alkaloidfraktion. Deren Zusammensetzung geht aus der nachfolgenden DC-Skizze hervor. Es überwiegen bei allen drei Methoden die Dragendorff positiven Substanzen SA 1 und SA 2. Der Anteil an Begleitstoffen ist jedoch unterschiedlich.

Abb. 2: DC-Vergleich der verschiedenen Extraktionsverfahren*



LM: CHCl_3 :MeOH 95:5

Det.: Dragendorff/ NaNO_2 10%

—— Dragendorff positiv

---- nach NaNO_2 10%
schwach positiv

Zuordnung:

1 = Soxhlet-Extraktion

2 = Perkolation

3 = Wasserdampfdestillation

* Zonen mit negativer Dragendorff Reaktion, die vor allem bei 1 und 2 auftraten, sind nicht vermerkt.

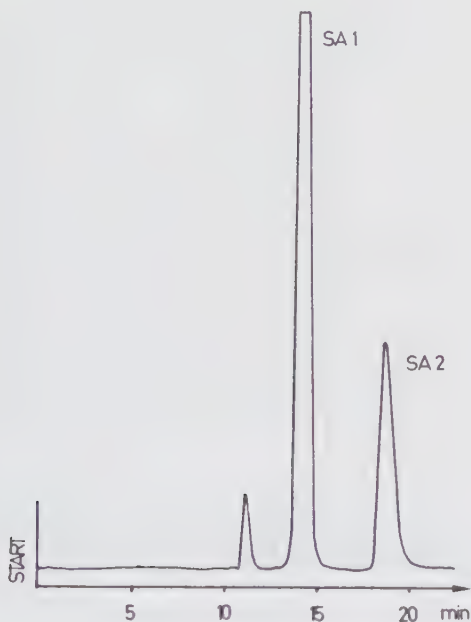
3.2. Isolierung von SA 1 und SA 2

Wir versuchten zunächst, die Isolierung von SA 1 und SA 2 durch präparative Schichtchromatographie auf Kieselgelplatten 0.5 mm zu erreichen. Orientierende Massenspektren zeigten jedoch, daß die so erhaltenen Verbindungen nicht rein waren. Daher verwendeten wir zur Isolierung die präparative HPLC.

Die HPLC von basischen Verbindungen erfolgt im allgemeinen auf "reversed phase" Materialien unter Zusatz eines Ionenpaarbildners (34) oder unter Verwendung basischer Puffersysteme, z.B. Ammoniumcarbonat (35). Im vorliegenden Fall zeigte sich, daß auf einer μ -Bondapak C 18 Säule weder bei Zugabe von PIC B7 Reagenz (Fa. Waters) noch bei Verwendung einer 10 mMol $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ -Lösung eine Trennung von SA 1 und SA 2 zu erreichen war. Erst die HPLC auf einer Kieselgelphase (Lichrosorb Si 60) mit n-Hexan:Ethylacetat 8:1 als mobiler Phase führte zu einer im präparativen Maßstab anwendbaren Trennung der Peaks. Dieses System wurde dann zur Isolierung herangezogen.

Bei dem Peak, der mit einer Retentionszeit von 11.2 Minuten auftrat, handelte es sich um eine Verunreinigung, die aus dem zum Ausschütteln verwendeten Ether p.a. stammt. In den anschließend durchgeführten GC/MS-Analysen (3.4.1.) trat die Verbindung ebenfalls auf. Sie konnte durch das Massenspektrum als BHT (2,6-Di-tert.-butyl-4-methylphenol) identifiziert werden, das dem Ether als Stabilisator zugesetzt wird.

Abb. 3: HPLC-Chromatogramm von DSA



Geräte- und Trennparameter, siehe Exp. Teil III. 3.5.

Ausgehend von 40 mg Rohalkaloidfraktion DSA konnten folgende Ausbeuten erzielt werden:

SA 1 : 8 mg

SA 2 : - (nicht wägbare)

SA 1 erwies sich nach DC-Untersuchung als rein. SA 2 konnte auch auf diese Weise nicht als Einzelsubstanz gewonnen werden. Es traten zusätzliche Zonen im oberen Rf-Wert Bereich auf. Offensichtlich handelte es sich hierbei um Zersetzungsprodukte.

3.3. Identifizierung von Substanz SA 1

Das UV-Spektrum, in Methanol aufgenommen, zeigte Maxima bei 267 nm, 305 nm und 320 nm, wobei eine starke Feinstruktur der längerwelligen Bande zu beobachten war.

Das Massenspektrum lieferte den Molekülpeak, der gleichzeitig den Basispeak darstellte, bei M^+ 129. Daneben trat mit der relativen Intensität von 30% ein Fragmention bei m/e 102 auf. Die anderen Signale waren ohne Bedeutung. Der Verlust von 27 Masseneinheiten ($M^+ - 27$) entspricht einer Abspaltung von Hydrogencyanid (HCN), wie sie für die Fragmentierung von Heterocyclen typisch ist (36). Da weitere Abspaltungen fast gänzlich fehlten, mußte eine unsubstituierte Verbindung vorliegen. Bei der Substanz SA 1 konnte es sich daher nach dem Molekulargewicht nur um Chinolin oder Isochinolin handeln.

Die eindeutige Identifizierung von SA 1 als Isochinolin erfolgte durch die vergleichende Dünnschichtchromatographie in verschiedenen Laufmittelsystemen, HPLC-Analyse auf einer μ -Bondapak C 18 Säule und die ^1H -NMR-Spektroskopie.

Abb. 4: Isochinolin

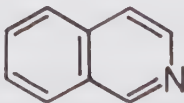
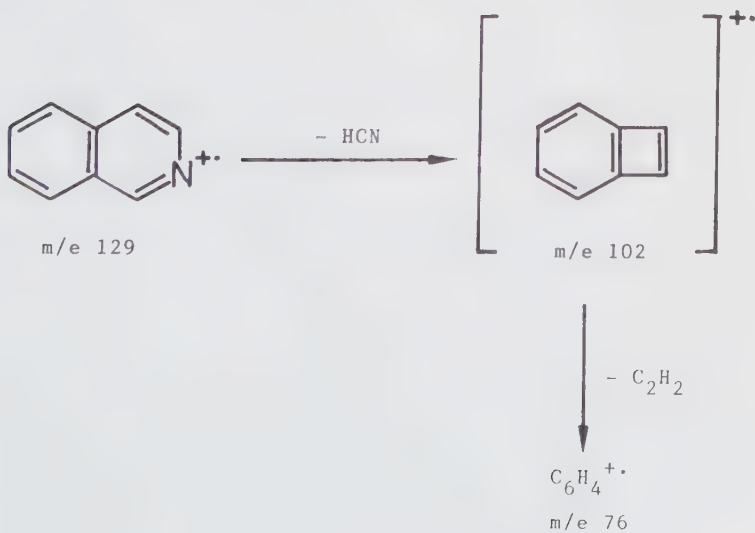
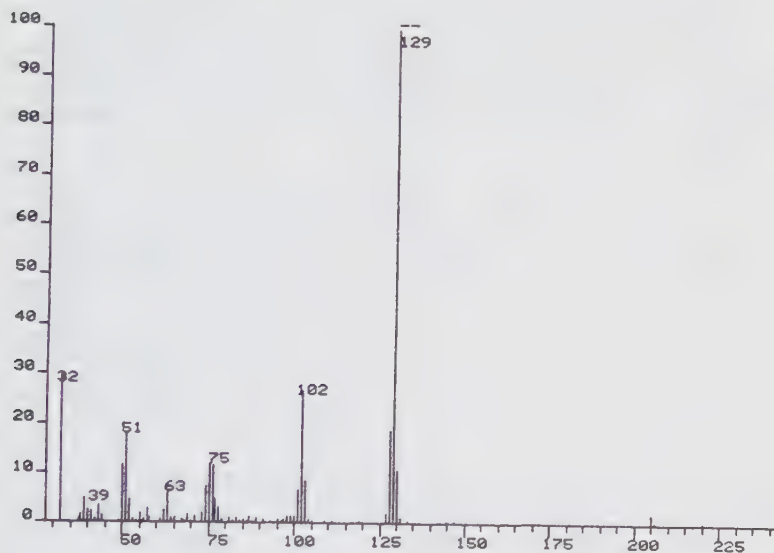


Abb. 5: Massenspektrum von SA 1 (= Isochinolin) und Fragmentierung (37)



Vorkommen von Isochinolin

Isochinolin kommt in kleinen Mengen im Steinkohlenteer vor (38). In Pflanzen wurde es bisher nur im Tabak- und Marihuanarauch identifiziert (39,40); doch soll es hier nicht genuin vorkommen, sondern erst beim Verbrennungsvorgang aus Proteinen entstehen (39). Obwohl Isochinolinalkaloide im Pflanzenreich weit verbreitet sind (41), ist über das Vorhandensein von Isochinolin noch nicht berichtet worden.

Um daher sicherzustellen, daß Isochinolin genuin in *Spigelia* enthalten ist und nicht von künstlichen Beimengungen stammt - Isochinolin dient z.B. als Ausgangsmaterial für Insektizide - wurden verschiedene Chargen von *Spigelia anthelmia* (vgl. Exp. Teil I) untersucht. Isochinolin konnte in allen Chargen zweifelsfrei identifiziert werden, so daß das genuine Vorkommen als gesichert gelten darf.

Eine Artefaktbildung im Lauf der Isolierungsarbeiten kann ebenfalls ausgeschlossen werden, da auch bei wechselnden Gewinnungsverfahren stets Isochinolin nachgewiesen werden konnte.

3.4. Charakterisierung von Verbindung SA 2

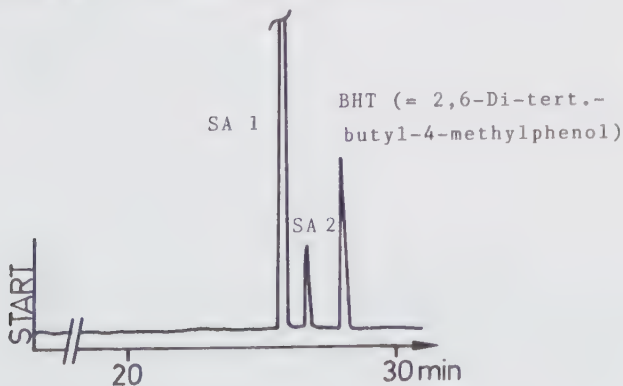
Trotz mehrfacher Isolierungsversuche unter Anwendung verschiedener Methoden (präparative DC und präparative HPLC) gelang es nicht, SA 2 in genügender Menge und Reinheit zu isolieren. Die Substanz neigte, teilweise schon während des Isolierungsgangs, zur Zersetzung. Außerdem war sie nur in so geringer Konzentration in *Spigelia* vorhanden, daß selbst bei sorgfältigster Aufarbeitung immer Substanzen anfielen, die noch verunreinigt waren.

Eine Charakterisierung von Verbindung SA 2 mußte daher aus dem Destillat erfolgen.

3.4.1. GC/MS-Analyse

Auf einer OV 225 Kapillarsäule ließ sich das Wasserdampfdestillat DSA bei Anwendung eines Temperaturprogramms trennen. Die Verbindungen SA 1 (= Isochinolin) und SA 2 erschienen mit Retentionszeiten von 26.11, bzw. 26.96 Minuten. Das Mengenverhältnis von SA 1 und SA 2 betrug dabei ungefähr 10:1.

Abb. 6: GC-Chromatogramm von DSA



Geräte- und Trennparameter, siehe Exp. Teil III.4.2.

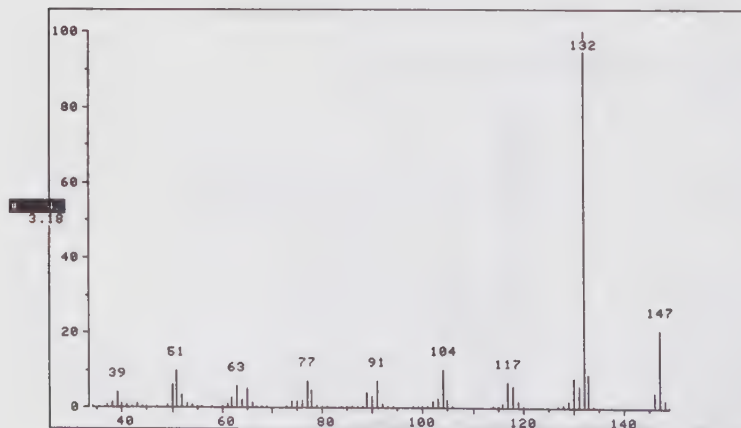
3.4.2. Festlegung von Strukturelementen

Die GC/MS-Analyse für SA 2 lieferte ein Massenspektrum mit dem Molekülpeak M^+ 147. Weitere charakteristische Fragmentationen traten auf bei m/e 132 (Basispeak), 117, 104, 91, 77, 63 und 51.

Das Spektrum ließ folgende Schlüsse zu:

- Aufgrund des starken $M^+ - 15$ Signals (m/e 132) mußte eine leicht abspaltbare Methylgruppe in SA 2 vorhanden sein.
- Da wie bei SA 1 im Spektrum von Verbindung SA 2 die charakteristischen Abspaltungen von 27 (HCN, m/e 77), bzw. 28 (H + HCN, m/e 104) Masseneinheiten zu beobachten waren, war das Vorliegen eines N-Heterocyclen sehr wahrscheinlich.

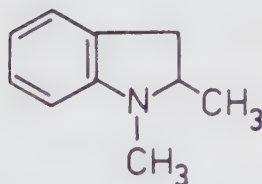
Abb. 7: Massenspektrum von Verbindung SA 2



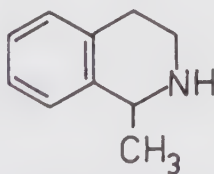
In der Literatur (42,43) sind folgende Verbindungen, die gleiches Molekulargewicht und ähnliche MS-Fragmentierungen wie SA 2 besitzen, bekannt:

- (I) 1,2-Dimethylindolin
- (II) 1-Methyl-1,2,3,4-tetrahydroisochinolin
- (III) 2-Methyl-1,2,3,4-tetrahydrochinolin
- (IV) Actinidin

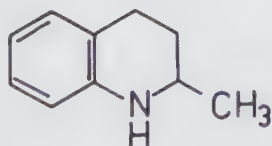
Abb. 8: Formeln der Verbindungen (I) - (IV)



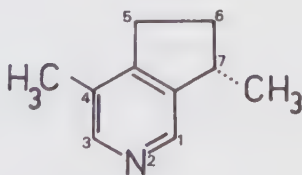
(I)



(II)



(III)



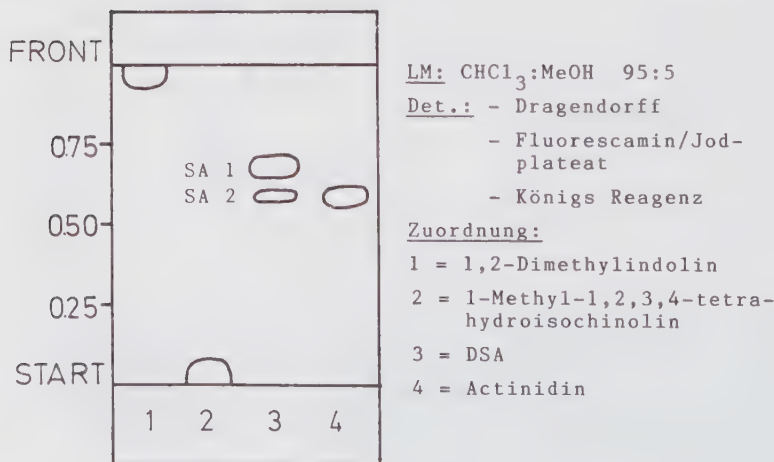
(IV)

Bei den Verbindungen (I) - (III) handelt es sich um synthetische Substanzen. Actinidin ist ein Monoterpenalkaloid, das erstmals von SAKAN (44) aus *Actinidia polygama* und später von TORSELL (45) und GROSS (46) aus *Valeriana officinalis* isoliert wurde.

Durch dünnschichtchromatographischen Vergleich prüften wir, ob SA 2 mit einer dieser Verbindungen identisch war. Die Substanzen (I) und (II) stellten wir durch Synthese her; Actinidin (IV) isolierten wir durch Wasserdampfdestillation aus den Wurzeln von *Valeriana officinalis*.

Die DC ergab für die Verbindungen (I) und (II) deutliche Rf-Wert Abweichungen von SA 2. Im Verlauf der Untersuchungen konnte (III), für das eine positive Reaktion mit Fluorescamin Reagenz (47) zu erwarten war, ebenfalls ausgeschlossen werden. Actinidin dagegen zeigte in der DC ähnliches Laufverhalten wie SA 2. Bei der GC-Analyse wurde jedoch eine geringe Abweichung in der Retentionszeit (26.41 Minuten) sichtbar. Gut stimmte das über HPLC on-line aufgenommene UV-Spektrum von SA 2 mit demjenigen von Actinidin überein. Das Maximum lag bei 265 nm.

Abb. 9: DC-Vergleich von SA 2 mit den Verbindungen (I), (II) und (IV)



Auch bei den auf der DC-Platte durchgeführten Farbreaktionen verhielten sich die Verbindungen SA 2 und Actinidin ähnlich:

- Positiv verlief die Detektion mit Königs Reagenz (48). Dies ist spezifisch für Pyridinverbindungen, die eine unsubstituierte α -Position besitzen.
- Bei Besprühen mit einer 0.02% igen Lösung von Fluorescamin in Aceton zeigte sich zunächst keine Reaktion. Bei Nachbehandlung der Platten mit Jodplateat trat eine braun-blaue Färbung im Sichtbaren auf. Dieses Verhalten ist typisch für tertiäre Stickstoffverbindungen. Dagegen reagieren primäre und sekundäre Amine bereits beim Besprühen mit Fluorescamin mit hell- bzw. dunkelblauer Fluoreszenz im UV 366 (47).

Obwohl es nicht gelang, SA 2 zweifelsfrei in seiner Struktur aufzuklären, ist jedoch durch die Untersuchungen aus dem Destillat das Vorliegen eines Pyridingrundgerüsts für SA 2 ziemlich sicher. Aufgrund der großen Ähnlichkeit mit Actinidin handelt es sich bei SA 2 möglicherweise ebenfalls um ein Monoterpenalkaloid vom Actinidintyp, das sich von diesem z.B. durch den Ort der Methylsubstitution unterscheiden könnte. Gestützt wird diese Annahme durch die Tatsache, daß in der Dichlormethanfraktion von Spigelia durch Dünnschichtchromatographie in zwei Laufmittelsystemen Secologanin nachgewiesen werden konnte (vgl. Exp. Teil IV.1.2.3.). Logenin und Secologanin stellen die biosynthetischen Vorstufen der Monoterpenalkaloide dar (49,50). Eine Artefaktbildung durch NH_3 -Zusatz bei der Aufarbeitung, wie sie z.B. bei den Monoterpenalkaloiden Gentianin und Cantleyin beobachtet wurde (49), kann ausgeschlossen werden, da SA 2 bereits im Alkaloid-Screening, bei dem mit Na_2CO_3 alkalisiert wurde, nachweisbar war. Auch als später NH_3 verwendet wurde, konnte keine Konzentrationszunahme von SA 2 festgestellt werden.

4. Untersuchung der quartären Alkaloide

Das Alkaloid-Screening hatte Hinweise auf das Vorliegen von quartären Stickstoffverbindungen gebracht. Eine orientierende DC im Laufmittel EtOAc:AcOH:H₂O 70:25:25 zeigte nach Detektion mit Dragendorff Reagenz eine stark violett gefärbte Zone bei Rf-Wert 0.1. Dies ist typisch für Cholin (51). Um sicherzustellen, daß Cholin genuin in Spigelia enthalten und nicht durch hydrolytische Prozesse entstanden ist, entwickelten wir für die quartären Alkaloide einen Isolierungsgang, bei dem starker Säurezusatz (Lecithinspaltung) und Alkalizusatz (Esterhydrolyse) vermieden wurde.

4.1. Extraktion

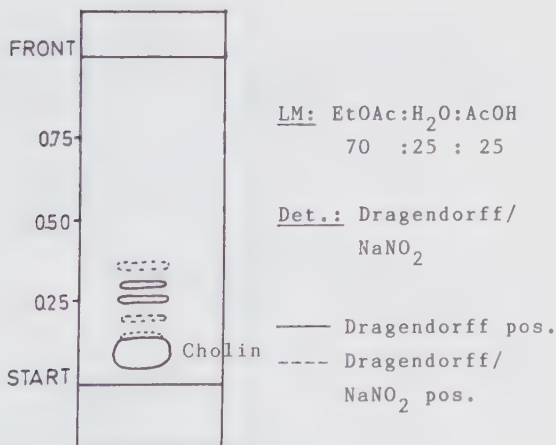
Wir unterzogen die Droge einer Mazeration mit 80% igem Methanol. Nach Abfiltrieren und Abpressen des Drogenrückstandes wurde der Methanolextrakt bis zur sirupartigen Konsistenz eingeeengt, mit heißem Wasser übergossen und erneut filtriert. Lipophile Bestandteile trennten wir durch Ausschütteln mit Petrolether und Dichlormethan ab. Die verbleibende wässrige Phase wurde nach Ansäuern mit HCl (pH 3) mit einer 4% igen Reinecke-Salz-Lösung versetzt. Eine vollständige Fällung erreichten wir durch 24 stündiges Stehenlassen bei 0 - 4°C. Zur Freisetzung der Alkaloide aus den Reineckaten gaben wir den in Aceton gelösten Niederschlag über eine Amberlite IRA-401 Anionenaustauschersäule. Die Elution der quartären Alkaloide erfolgte mit Aceton:H₂O 1:1. Nach Abzug des Lösungsmittels gewannen wir auf diese Weise die quartäre Alkaloidfraktion. Aus 500 g Droge wurden 0.23 g einer gefärbten Masse erhalten.

4.2. Reinigung

Nachdem in dem so gewonnenen Extrakt noch weitere Begleitstoffe vorhanden waren, führten wir eine erneute Ionenaustauschchromatographie durch. In Anlehnung an eine Vor-

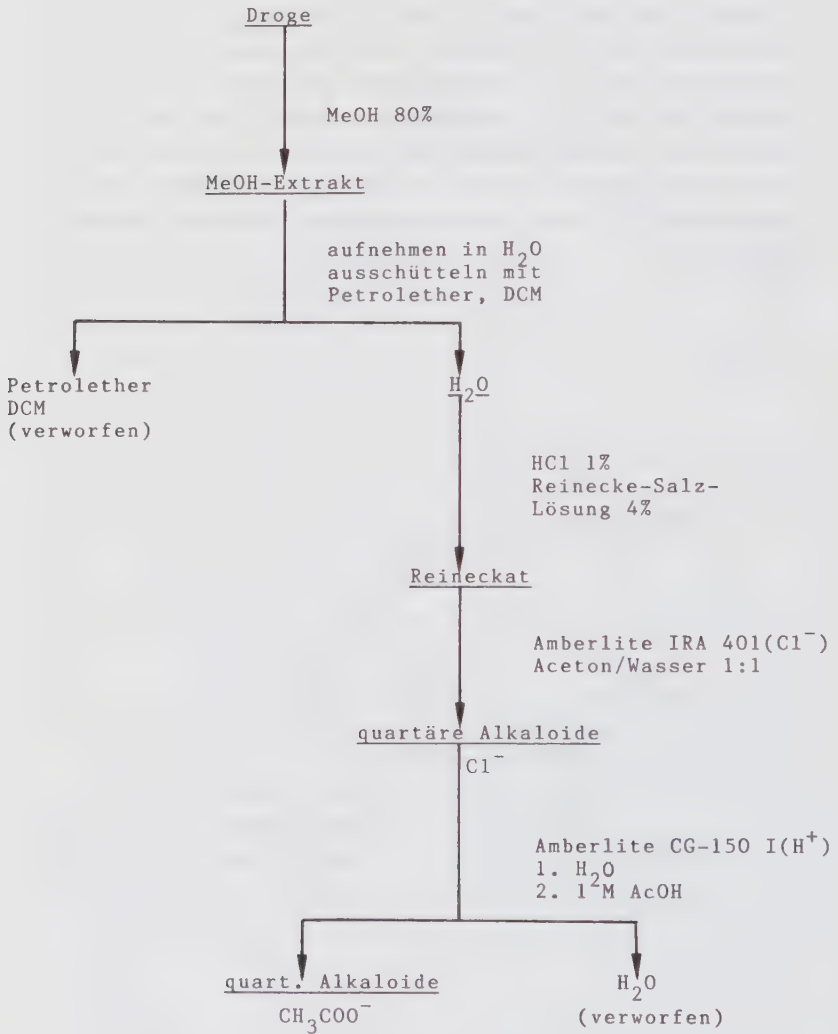
schrift von CLAUSEN (52) gaben wir eine wässrige Lösung der quartären Alkaloidfraktion über eine Amberlite CG-50 I Kationenaustauschersäule. Die quartären Alkaloide wurden gebunden, während nicht kationische Verbindungen mit Wasser eluiert wurden. Die Desorption der Stickstoffverbindungen erfolgte mit 1M Essigsäure. Auf diese Weise konnten die quartären Alkaloide in Form ihrer Acetate angereichert werden. Es zeigte sich jedoch, daß große Verluste auftraten. So konnte nach diesem Reinigungsschritt nur ungefähr 50% der eingesetzten Menge wiedergefunden werden.

Abb. 10: DC der quartären Alkaloidfraktion^{*}



^{*} Es sind nur Dragendorff/NaNO₂ positive Zonen berücksichtigt.

Abb. 11: Extraktionsschema der quartären Alkaloidfraktion



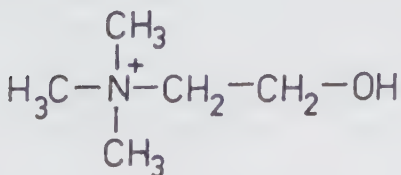
4.3. Identifizierung von Cholin

Im DC-Chromatogramm (vgl. Abb. 10) fiel neben einigen Dragendorff/ NaNO_2 positiven Zonen im R_f -Bereich 0.2 - 0.4 vor allem die stark violett gefärbte Zone bei R_f -Wert 0.1 auf. Sie stellte den Hauptanteil der quartären Alkaloidfraktion dar. DC-Vergleich mit Cholin bestätigte die bereits vermutete Identität. Über präparative DC im Laufmittelsystem $\text{EtOAc:AcOH:H}_2\text{O}$ 70:25:25 isolierten wir aus 40 mg quartärer Alkaloidfraktion 7 mg Cholin.

Das daraus hergestellte Reineckat zeigte gleichen Schmelzpunkt wie authentisches Cholinreineckat. Bei der Mischschmelzpunktbestimmung erfolgte keine Depression. Darüberhinaus wurde die Identität durch ein ^1H -NMR-Spektrum (vgl. Abb. 13) bewiesen.

Cholin ist ein ubiquitärer Pflanzeninhaltsstoff (53). Es kommt sowohl in freier Form als auch gebunden, z.B. als Lecithinbestandteil, vor. Daneben lassen sich auch verschiedene Cholinester in Pflanzen nachweisen (vgl. Tabelle 2). In der Familie der Loganiaceae wurde Cholin in den Samen von *Strychnos nux vomica* gefunden (54).

Abb. 12: Cholin



4.4. Cholinester

Nachdem die Identität von Cholin bewiesen war, lag die Vermutung nahe, daß es sich bei den weiteren Dragendorff, bzw. Dragendorff/ NaNO_2 positiven Zonen mit Rf-Wert 0.2 - 0.4 um Cholinester handeln könnte.

4.4.1. Hydrolysen

Nach alkalischer Hydrolyse einer cholinfreien Gesamtfraction, die durch präparative DC (vgl. 4.3.) erhalten worden war, ließ sich im Hydrolysat wieder dünnstschichtchromatographisch Cholin nachweisen. Allerdings war der Verlust an Estern durch starke adsorptive Bindung ans Kieselgel so groß, daß für eine Säurebestimmung die gesamte quartäre Alkaloidfraktion eingesetzt werden mußte.

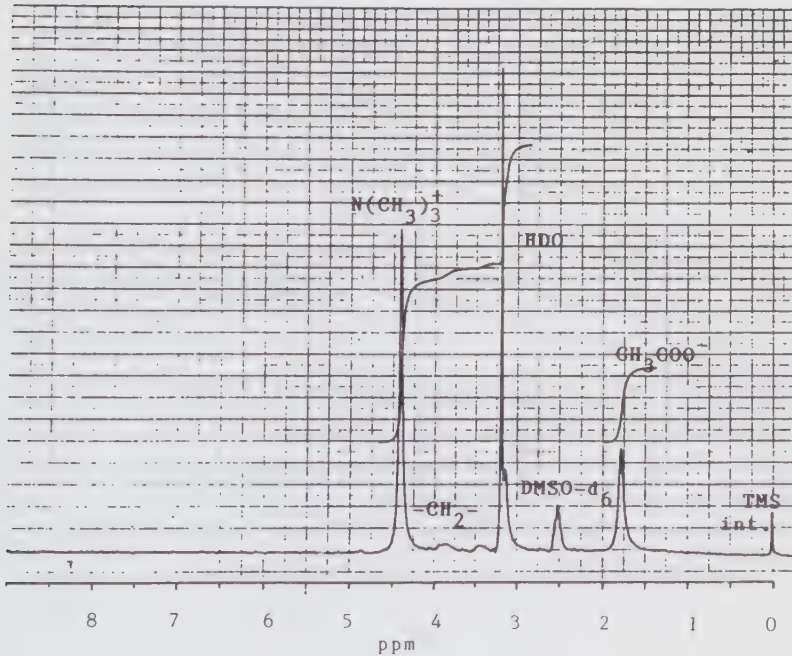
18 mg quartäre Alkaloidfraktion wurden mit 10% iger Natronlauge bei Raumtemperatur hydrolysiert. Die eiskühlte Lösung wurde mit 10%iger Salzsäure angesäuert und mit Ethylacetat ausgeschüttelt. Nach Trocknen über Na_2SO_4 wurde das Lösungsmittel durch Einleiten von Stickstoff entfernt. Dieses Verfahren wurde gewählt, um eventuell vorhandene flüchtige Säuren mitzuerfassen.

4.4.2. Nachweis von Cholin

Die saure, wässrige Lösung wurde mit Natronlauge neutralisiert und über eine Amberlite CG-50 I Kationenaustauschersäule gegeben. Das weitere Vorgehen erfolgte wie bereits unter 4.2. beschrieben. Die essigsäure Lösung wurde am Vakuum zur Trockene eingengt, in Methanol aufgenommen und membranfiltriert.

Die DC-Überprüfung zeigte, daß die Dragendorff/ NaNO_2 positiven Zonen im Rf-Wert Bereich 0.2-0.4 nicht mehr vorhanden waren; es ließ sich nur Cholin nachweisen. Die Identität von Cholin wurde durch ^1H -NMR-Spektroskopie nochmals bestätigt.

Abb. 13: 80 MHz ^1H -NMR-Spektrum von Cholinacetat



4.4.3. Identifizierung der Säuren

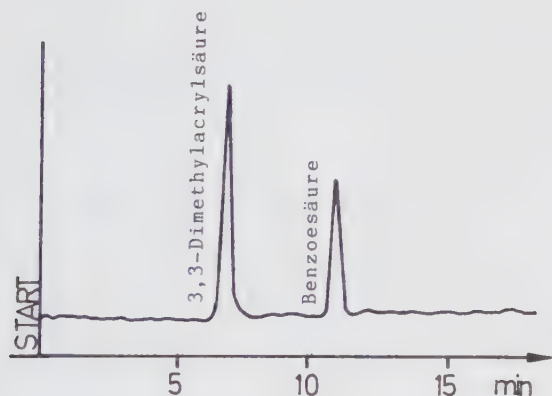
Nachdem sichergestellt war, daß vor Hydrolyse keine freien Säuren in der quartären Alkaloidfraktion enthalten waren, wurden die durch Hydrolyse und Ethylacetatausfällung (4.4.1.) gewonnenen Säuren durch Kombination verschiedener Methoden identifiziert.

Die Dünnschichtchromatographie erfolgte in zwei Laufmittelsystemen auf Cellulose- und Kieselgelplatten. Es zeigte sich neben einer sehr schwachen Zone am Start, die von Verunreinigungen herrühren dürfte, nur ein Hauptfleck bei Rf-Wert 0.5 (Cellulose, LM: n-BuOH/NH₃ gesättigt), bzw. 0.7 (Kieselgel, LM: DCM:Toluol:HCOOH 50:40:10). Mitaufgetragene Referenzverbindungen ließen Identität mit Benzoesäure vermuten. Später wurde gezeigt, daß sich 3,3-Dimethylacrylsäure in der DC ähnlich wie Benzoesäure verhält.

Die HPLC-Untersuchung der Säurefraktion auf einer Lichrospher RP 18 Säule mit einem Acetonitril-Wasser Gradienten, dem 2% Essigsäure zugesetzt worden waren, als mobiler Phase ergab zwei Peaks. Durch Überspritzen mit Referenzsubstanzen konnten diese der 3,3-Dimethylacrylsäure und der Benzoesäure zugeordnet werden.

Die nachfolgende Abbildung gibt das HPLC-Chromatogramm wieder.

Abb. 14: Hochdruckflüssigchromatographie der Säuren



Geräte- und Trennparameter, siehe Exp. Teil III.3.4.

Bei der gaschromatographischen Bestimmung prüften wir zunächst auf flüchtige Säuren, die sich underivatisiert auf einer Diethylhexylsebacinat/Sebacinsäure Säule trennen lassen. Bei isothermen Bedingungen ließ sich 3,3-Dimethylacrylsäure nachweisen. Bei einer Retentionszeit von 11.6 Minuten erschien ein weiterer Peak, der jedoch auch in einer parallel durchgeführten Blindprobe* enthalten und somit keiner Säure zuzuordnen war.

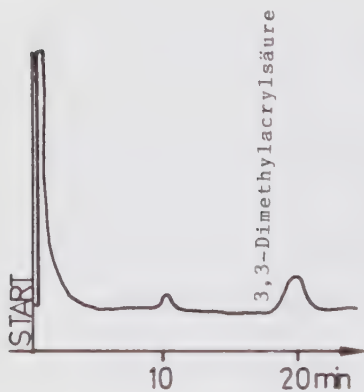
* Die Herstellung der Blindprobe erfolgte analog der Analysenlösung (vgl. Exp. Teil IV.1.3.4.)

Zur Untersuchung der nicht flüchtigen Säuren überführten wir diese durch 10 minütiges Erhitzen mit BSTFA (bis(Tri-methylsilyl)-trifluoro-acetamid) bei 125°C in die silanierten Verbindungen.

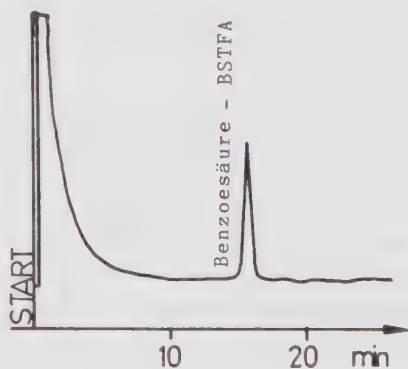
Bei Trennung auf einer OV 210 Glassäule und Anwendung eines Temperaturprogramms konnte wieder Benzoesäure mit einer Retentionszeit von 15.6 Minuten identifiziert werden. 3,3-Dimethylacrylsäure war unter diesen Bedingungen im Lösungsmittelpeak enthalten.

Weitere Säuren waren mit keiner der drei Methoden nachweisbar.

Abb. 15: Gaschromatographie der Säuren



GC der underivati-
sierten Säuren



GC der BSTFA-Ver-
bindungen

Geräte- und Trennparameter, siehe Exp. Teil III.4.2.

4.4.4. DC-Vergleich mit synthetischen Verbindungen

Nach diesen Untersuchungen schien das Vorhandensein von 3,3-Dimethylacryloylcholin (= Senecierylcholin) und Benzoylcholin gesichert. Aufgrund der sehr geringen Mengen an Cholinestern verzichteten wir auf eine Isolierung und bewiesen die Identität durch DC-Vergleich mit synthetischen Verbindungen in verschiedenen Laufmittelsystemen. Wie Abb. 17 zeigt, konnten die Ester-Hauptzonen der quartären Alkaloidfraktion 3,3-Dimethylacryloylcholin und Benzoylcholin zugeordnet werden. Für die weiteren Dragendorff/ NaNO_2 positiven Zonen war keine Aussage möglich. Da, wie aus der DC ersichtlich, diese Verbindungen noch geringer konzentriert waren als die identifizierten Ester, führten wir keine weiteren Untersuchungen durch.

Abb. 16: Benzoylcholin (I) und 3,3-Dimethylacryloylcholin (II)

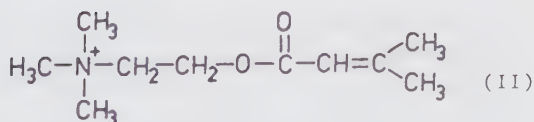
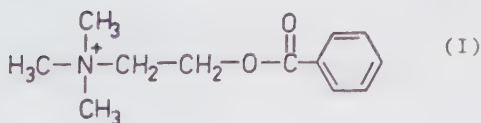
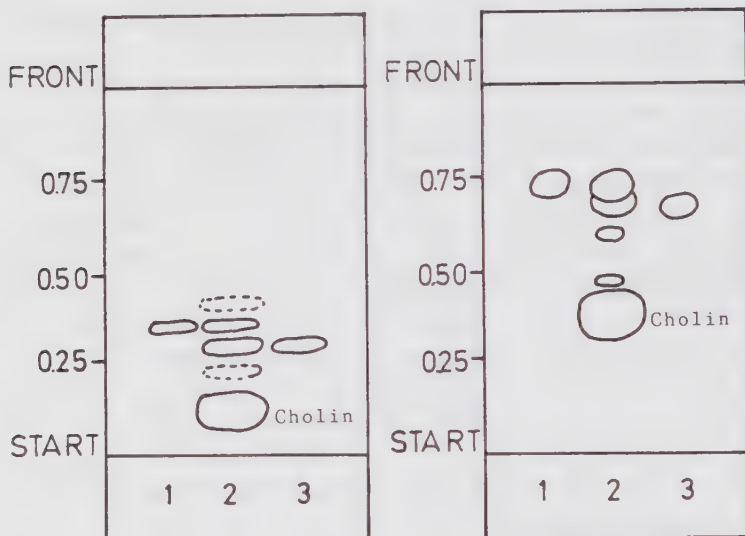


Abb. 17: DC-Vergleich der Cholinester^{*}



HPTLC-Kieselgel-
platte

LM: EtOAc:H₂O:AcOH
70 : 25 : 25

Det.: Dragendorff/
NaNO₂

—— Dragendorff pos.

----- Dragendorff/NaNO₂ pos.

Cellulose-Platte

LM: n-BuOH:H₂O:AcOH
40 : 50 : 10
(Oberphase)

Det.: Dragendorff

Zuordnung: 1 = Benzoylcholin

2 = quartäre Alkaloidfraktion

3 = 3,3-Dimethylacryloylcholin

* Nur Dragendorff/NaNO₂ positive Zonen sind berücksichtigt.

4.4.5. Quantitative Bestimmung der Ester

Um spätere Aussagen darüber machen zu können, inwiefern die Cholinester an der pharmakologischen Gesamtwirkung der *Spigelia* beteiligt sind, führten wir eine quantitative Bestimmung der Ester durch.

In tierischem Gewebematerial werden Cholin, bzw. Cholinester durch Gaschromatographie nach Derivatisierung (N-De-methylierung mit Natriumthiophenolat oder Pyrolyse, Reduktion mit NaBH_4) im Mikromaßstab bestimmt (55,56,57).

Wir ermittelten in einem einfacheren und apparativ weniger aufwendigem Verfahren nach Hydrolyse der Ester die Konzentration der Säuren mit Hilfe der HPLC nach der Methode des externen Standards. Dadurch ließ sich indirekt die Konzentration der Ester errechnen. Für Benzoylcholin wurde ein Gehalt von ca. 0.0004%, für 3,3-Dimethylacryloylcholin ein ungefährender Gehalt von 0.001%, bezogen auf die getrocknete Droge, ermittelt. Die Genauigkeit dieser Methode war im vorliegenden Fall ausreichend. Aufgrund der Instabilität der Ester können größere Schwankungen im Cholin/Cholinester-Verhältnis auftreten. So bauen sich Cholinester in wässriger Lösung schnell ab; enzymatische Hydrolyseprozesse bei Trocknung und Lagerung der Droge sind ebenfalls nicht auszuschließen (53,58).

4.5. Vorkommen von Cholinestern in Pflanzen

Während über das Vorkommen von Acetylcholin in Pflanzen häufig berichtet wurde, sind Cholinester mit längerkettigen, bzw. höhermolekularen Säuren weit weniger verbreitet. Ihr Vorkommen ist hauptsächlich in verschiedenen Cruciferen-Arten, hier vor allem in den Samen, beschrieben worden.

3,3-Dimethylacryloylcholin fand man bisher nicht in Pflanzen. Es wurde jedoch aus der Hypoglandialdrüse von *Thais floribunda*, einer im Meer lebenden Schneckenart, isoliert (59). Über das Vorkommen von Benzoylcholin in Pflanzen ist nichts bekannt.

In der nachfolgenden Tabelle sind die wichtigsten, bisher aus Pflanzen isolierten Cholinester aufgeführt.

Tabelle 2: Vorkommen von Cholinestern in Pflanzen

Bezeichnung	Vorkommen	Literatur
Acetylcholin	Crataegus-Arten Capsella bursa past. Digitalis-Arten Secale cornutum Viscum album Urtica dioica Solanum tuberosum u.a.	(60) (53)
Propionylcholin	Viscum album	(61)
4-Hydroxy-benzoyl- cholin	Sinapis alba	(52)
Sinapin (3,5-Dimethoxy- 4-hydroxy-cinna- moylcholin)	allg. in Cruciferen (z.B. Brassica nigra, Sinapis alba)	(62)
Feruloylcholin (4-Hy- droxy-3-methoxy-cinna- moylcholin)	Cleome plungens	(63)
Isoferuloylcholin (3-Hydroxy-4-methoxy- cinnamoylcholin)	Sibara virginica	(64)
Hesperalin (2,4-Di- methoxy-benzoylcholin)	Hesperis matronalis	(65)
p-Cumaroylcholin (4-Hy- droxy-cinnamoylcholin)	Iberis umbellata	(66)
Ascorbinoylcholin	Apium graveolens	(67)

5. Flavonoide und Phenolcarbonsäuren

5.1. Extraktbereitung

Da im Screening-Verfahren (vgl. 2.2.) Flavonoide und Phenolcarbonsäuren nachgewiesen worden waren, untersuchten wir auch diese Verbindungsklasse.

Durch Soxhletextraktion stellten wir aus 200 g Droge einen Methanolextrakt her. Dieser wurde von Chlorophyll und weiteren Ballaststoffen befreit und mit Wasser gegen Ethylacetat ausgeschüttelt. Die Ethylacetatfraktion enthielt hauptsächlich Phenolcarbonsäuren (Ausbeute: 2.5 g = 4.75% des Methanolextraktes). Eine angereicherte Flavonoidfraktion erhielten wir durch anschließende Extraktion der wässrigen Phase mit Butanol (4.4 g = 8.4% des Methanolextraktes).

5.2. Phenolcarbonsäuren

Die Identifizierung der Säuren erfolgte durch Co-Chromatographie in verschiedenen Laufmittelsystemen. Die Chromatogramme wurden im UV 254, UV 366, sowie nach Besprühen mit FeCl_3 und Naturstoff/PÄG ausgewertet, wobei sich jeweils charakteristische Färbungen und UV-Fluoreszenzen ergaben. So konnten in der Ethylacetatfraktion nachgewiesen werden:

Chlorogensäure

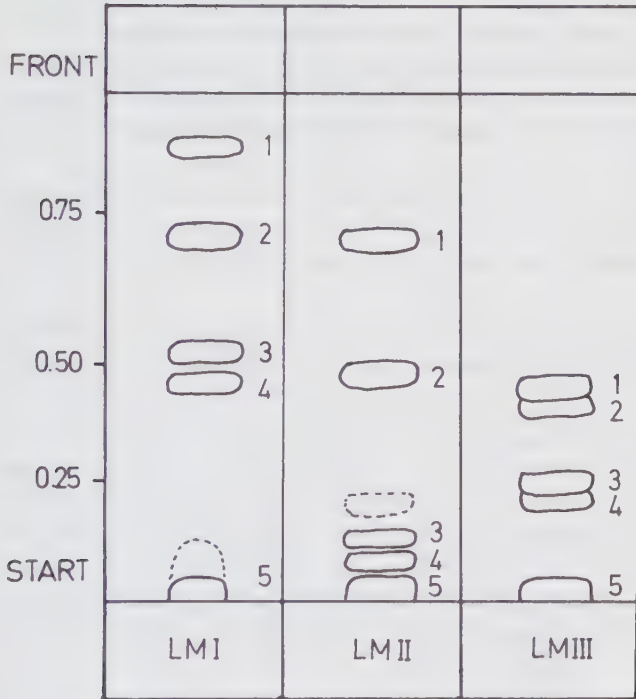
Protocatechusäure

Kaffeesäure

2,3-Dihydroxybenzoesäure

Vanillinsäure

Abb. 18: DC-Skizze der in der Ethylacetatfraktion nachgewiesenen Phenolcarbonsäuren



DCM 100	DCM 50	Toluol 50
H ₂ O 50	Toluol 40	Ether 50
AcOH 50	HCOOH 10	ges. 10% AcOH
(Unterphase)	(2x entw.)	

Detektion:

UV 254
UV 366
FeCl₃
Naturstoff/PÄG

Zuordnung:

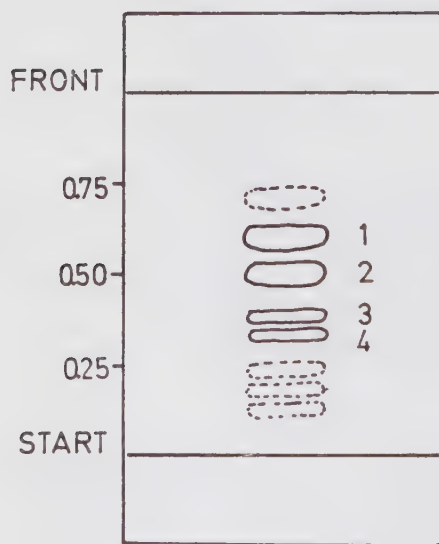
1 = Vanillinsäure
2 = 2,3-Dihydroxybenzoesäure
3 = Kaffeesäure
4 = Protocatechusäure
5 = Chlorogensäure

5.3. Flavonoide

5.3.1. Dünnschichtchromatographie

Die Dünnschichtchromatographie der Butanolfraktion erfolgte im allgemeinen Flavonoid-Laufmittel EtOAc:AcOH:HCOOH:H₂O 100:11:11:26. Hauptverbindung war neben Chlorogensäure Hyperosid. Im unteren R_f-Wert Bereich fanden sich weitere, nach Detektion mit Naturstoff/PÄG orange fluoreszierende Verbindungen.

Abb. 19: DC-Skizze der Butanolfraktion



Zuordnung:

- 1 = Hyperosid
- 2 = Chlorogensäure

LM:

EtOAc:AcOH:HCOOH:H₂O
100 : 11 : 11 : 26

Det.:

UV 254, UV 366
FeCl₃
NST/PÄG

5.3.2. Hydrolysen

Zur näheren Charakterisierung der Flavonglykoside bestimmten wir die Zuckerbestandteile und Aglyka der Hauptverbindungen. Durch präparative Schichtchromatographie gewannen wir angereicherte Fraktionen der Flavonoide 1, 3 und 4 (vgl. Abb. 19). Je 2 - 5 mg Substanz hydrolysierten wir mit 2N Trifluoressigsäure am Dampfbad. Danach wurde die Trifluoressigsäure durch mehrmaliges Abrotieren mit Methanol entfernt. Den Rückstand nahmen wir in wenig Wasser auf und schüttelten mehrmals gegen Ethylacetat aus. Die wässrige Phase wurde für die DC der Zucker, die getrocknete Ethylacetatfraktion für die DC der Aglyka verwendet.

Als Aglykon fanden wir bei allen drei Flavonoiden Quercetin; als Zuckerbestandteile konnten Galaktose, Glucose und Rhamnose nachgewiesen werden.

Bestätigt wurde dieses Ergebnis durch Mikrohydrolyse auf der DC-Platte. Die eluierten Zonen 1, 3 und 4 wurden auf zwei Kieselgelplatten aufgetragen und 45 Minuten in eine HCl-Atmosphäre gestellt. Nach vollständigem Entfernen der Salzsäure wurden die Platten im Aglykon- und Zuckerlaufmittel entwickelt.

Tabelle 3: Ergebnis der Hydrolyse

Fraktion	Rf-Wert	Aglykon	Zucker
1	0.60	Quercetin	Galaktose
3	0.38	Quercetin	Glucose Rhamnose
4	0.30	Quercetin	Glucose

Substanz 1 konnte auf diese Weise eindeutig als Hyperosid identifiziert werden.

Bei Verbindung 3 sollte ein Diglykosid mit Rhamnose und Glucose als Zuckerbestandteilen vorliegen. Das bei der HPLC-Analyse simultan aufgenommene UV-Spektrum (vgl. 5.4.) lieferte die Bande I bei 355 nm und die Bande II bei 255 nm. Die Lage der Maxima ließ darauf schließen, daß es sich bei Verbindung 3 um ein in 3-Stellung, bzw. in 3- und 7-Stellung glykosidiertes Flavonol handelte. Die Substanz verhielt sich in der DC identisch wie Rutin, in der HPLC erschien Rutin jedoch mit etwas geringerer Retentionszeit (14.1 Minuten). Als mögliche, in der Literatur aufgeführte Verbindungen kommen somit Quercetin-3-O-neohesperidosid, bzw. Quercetin-3-O-glucosyl-7-O-rhamnosid oder Quercetin-3-O-rhamnosyl-7-O-glucosid in Frage.

Bei Verbindung 4 sollte es sich aufgrund der Zuckeranalyse und des niedrigen R_f-Werts um ein Quercetin-diglucosid handeln. Das UV-Spektrum machte wieder eine Glykosidierung in 3-, bzw. in 3- und 7-Stellung wahrscheinlich. Quercetin-3-O-sophorosid und Quercetin-3-O-gentiobiosid, die als Vergleichssubstanzen zur Verfügung standen, konnten aufgrund ihrer zu tiefen R_f-Werte ausgeschlossen werden. Möglich wäre, daß es sich bei Verbindung 4 um das in der Literatur beschriebene Quercetin-3,7-diglucosid handelt (68,69).

Eine genaue Strukturaufklärung der Flavonoide war im Rahmen dieser Arbeit nicht vorgesehen.

5.4. HPLC-Untersuchung

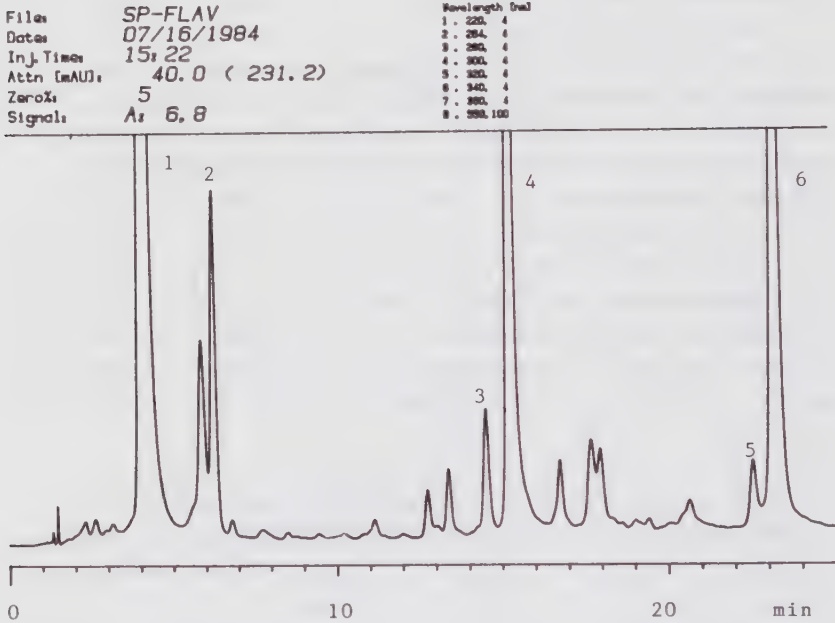
Ziel der HPLC-Untersuchung war es, einen charakteristischen "Finger-print" für die Droge *Spigelia anthelmia* zu erstellen.

Die vorhergehenden Arbeiten hatten gezeigt, daß sich der Großteil der Säuren in der Ethylacetatfraktion, die Hauptmenge der Flavonoide in der Butanolausschüttelung befand. Zur HPLC-Analyse verwendeten wir eine Butanolausschüttelung des Methanolextraktes, der durch Versetzen mit Dichlormethan vorgereinigt worden war.

Durch Überspritzen mit Vergleichssubstanzen konnten die Peaks 1,2 und 4 der Chlorogensäure bzw. der 2,3-Dihydroxybenzoesäure, der Kaffeesäure und dem Hyperosid zugeordnet werden. Bei den Peaks 3 und 5 handelt es sich um die Zonen 3 und 4 der präparativen DC.

Die nachfolgende Abbildung zeigt das HPLC-Chromatogramm der Butanolausschüttelung von *Spigelia anthelmia*.

Abb. 20: HPLC-Chromatogramm der Butanolfraktion von
Spigelia anthelmia



Zuordnung:

1 = Chlorogensäure

2,3-Dihydroxybenzoesäure

2 = Kaffeesäure

3 = Zone 3 präp. DC

4 = Hyperosid

5 = Zone 4 präp. DC

6 = nicht identi-
fiziert

Geräte- und Trennparameter, siehe Exp. Teil III.3.4.

6. Vergleichende dünn-schicht-chromatographische Untersuchungen

In einer Studie von JOHNSON (15) hatten sich vor allem die Samen von Spigelia anthelmia als sehr toxisch erwiesen. Um zu prüfen, inwiefern Alkaloide an dieser Wirkung beteiligt sein könnten, bezogen wir die Samen von Spigelia anthelmia in das Alkaloid-Screening mit ein.

Gleichzeitig stand uns in geringer Menge noch eine zweite Spigelia-Art, nämlich Spigelia humboldtiana Champ. & Schlecht., zur Verfügung.

Je 20 g Droge wurden nach dem für Spigeliae Herba angeführten Screening-Verfahren extrahiert und dünn-schicht-chromatographisch auf Alkaloide untersucht. Die Prüfung auf tertiäre, bzw. flüchtige Alkaloide verlief bei beiden Drogen negativ. Weder SA 1 noch SA 2 konnten nachgewiesen werden. Bei Versetzen des wässrigen Rückstandes mit Reinecke-Salz-Lösung erhielten wir jedoch eine Fällung. Nach Zerlegung der Reineckate nach der üblichen Methode und anschließender DC konnte jeweils Cholin als Hauptverbindung nachgewiesen werden. Erst beim Nachbesprühen mit NaNO_2 -Lösung reagierten im R_f -Wert Bereich 0.2 - 0.6 noch weitere Zonen schwach positiv.

Eine weitere Untersuchung erfolgte nicht.

7. Pharmakologische Untersuchungen*

Die pharmakologische Testung auf Herz-Kreislaufwirksamkeit erfolgte in vivo an Meerschweinchen und Ratte und in vitro an isolierten Meerschweinchenvorhöfen. Untersucht wurden sowohl der methanolische Gesamtextrakt von *Spigelia anthelmia* als auch die Verbindung SA 1 (= Isochinolin).

Die Prüfung des Methanolextraktes in vivo am Meerschweinchen zeigte bei i.v. Applikation von 10, bzw. 20 mg/kg eine signifikante Blutdrucksteigerung. Bei der Dosis 10 mg/kg betrug die Hypertonie nach 30 Minuten 17.6%, bei 20 mg/kg war sie mit 40.6% noch ausgeprägter. Die Wirkung ist möglicherweise auf die Anwesenheit der Cholinester im Extrakt zurückzuführen.

Während Cholin selbst im Vergleich zu Acetylcholin eine 10000 bis 100000 mal geringere Aktivität besitzt, zeigen 3,3-Dimethylacryloylcholin und in geringerem Umfang auch Benzoylcholin neben einer schwachen muskarinähnlichen, eine starke nikotinartige Wirkung. So ist z.B. die Wirksamkeit von 3,3-Dimethylacryloylcholin an den vegetativen Ganglien 10 mal so hoch wie die des Acetylcholin, an den parasympathischen Nervenendigungen jedoch nur 1/1000 so stark. Außerdem wird 3,3-Dimethylacryloylcholin durch die Cholinesterasen im Plasma nicht gespalten (70,71,72,73).

Interessant sind die nach i.v. Applikation des Methanolextraktes an der Ratte hervorgerufenen Effekte. Nach Gabe von 10 mg/kg und mehr noch nach 30 mg/kg zeigte sich ein signifikanter Blutdruckanstieg, der von einer langanhaltenden (ca. 45 Minuten) Blutdrucksenkung gefolgt wurde. Parallel dazu trat eine Bradykardie auf. Als Ursache hierfür kann wieder die ganglienstimulierende Wirkung der Cholinester diskutiert werden, die möglicherweise nach kurzzeitiger Erregung - ähnlich wie Nikotin - eine Lähmung sympathischer Ganglien und damit eine Blutdrucksenkung hervorrufen.

* Die pharmakologischen Untersuchungen wurden von der Fa. Madaus, Köln, durchgeführt.

In der nachfolgenden Tabelle sind die genauen Versuchsergebnisse beider Testsysteme aufgeführt.

Tabelle 4: Beeinflussung des Blutdrucks in vivo an Meer-schweinchen und Ratte durch einen Spigelia-Methanolextrakt

Meerschweinchen:

Zeit min nach Applik.	syst. Druck A. carotis mm Hg		Mitteldruck A. carotis mm Hg	
	10 mg/kg	20 mg/kg	10 mg/kg	20 mg/kg
Vorwert	45.8	48.3	35.4	36.8
Inj.ende	46.1	44.8	36.0	34.5
1	48.5	47.3	38.0	37.1
2	48.8	49.3	38.3	38.8
3	48.9	50.5	38.0	40.0
4	49.5	51.4	38.9	40.8
5	50.4	52.1	39.8	41.4
10	51.3	56.0	40.0	44.8
15	51.6	55.6	40.1	45.8
30	54.0	66.5	41.3	53.8
45	53.6	61.4	41.4	50.3
60	55.0	61.8	43.1	48.5

<u>Ratte:</u>				
	10 mg/kg	30 mg/kg *	10 mg/kg	30 mg/kg *
Vorwert	121.3	120.8	87.5	85.7
Inj.ende	144.1	136.3	115.5	111.7
1	152.6	139.0	123.5	115.3
2	152.6	131.8	124.5	111.7
3	148.2	127.5	121.9	108.7
4	144.3	124.0	119.5	106.2
5	141.1	120.0	117.7	102.8
10	131.1	110.7	108.8	92.8
15	120.8	108.0	99.3	89.8
30	109.3	104.2	82.0	85.4
45	106.6	104.2	75.4	84.4
60	113.3	106.4	80.1	85.4

* In dieser Dosisgruppe verstarb ein Tier 25 Minuten nach der Injektion.

Die in vitro Untersuchung an isolierten Meerschweinchen-vorhöfen ergab bei Konzentrationen von 10, bzw. 100 µg Methanolextrakt/ml Badflüssigkeit eine mit zunehmender Einwirkzeit größer werdende negativ inotrope (50 - 70%) und negativ chronotrope (10 - 15%) Wirkung. Neben einem möglichen ganglienblockierenden Effekt muß eine unspezifische Schädigung des Muskels durch weitere Inhaltsstoffe des Gesamtexttrakts in Betracht gezogen werden. Außerdem können sich gerade bei Prüfung von Gesamtexttrakten - wie bereits von GREVEL (74) mehrfach beobachtet - verschiedene Wirkprinzipien überlagern.

Wurde nämlich im gleichen Versuchsmodell Substanz SA 1 in Dosen von 100 - 500 µg/ml Badflüssigkeit geprüft, so zeigte sich eine signifikante, dosisabhängige positiv inotrope Wirkung. Bei Gabe von 500 µg/ml Badflüssigkeit betrug die Kontraktionskraftzunahme am rechten, spontan schlagenden Vorhof 120%; am linken Vorhof wurde sogar ein Maximum von 435% innerhalb von 8 Minuten registriert.

Die Ergebnisse zeigen, daß der Spigelia-Droge eine Herzwirksamkeit zukommt. Wie die bisherigen Versuche erkennen lassen, scheinen mehrere Komponenten an der Gesamtwirkung beteiligt zu sein. Eine abschließende Beurteilung ist erst nach Durchführung weiterer Tests möglich.

Angereicherte Fraktionen von Spigelia anthelmia befinden sich zur pharmakologischen Prüfung bei der Fa. Madaus, Köln.

8. Zusammenfassung der in Teil I (Spigelia anthelmia L.)
erhaltenen Ergebnisse

Spigelia anthelmia L. stellt eine in der Volksmedizin und Homöopathie bedeutsame Droge dar. Obwohl bereits in früheren Arbeiten (6) von einer Alkaloidführung der Droge berichtet wird, gelang es bisher nicht, Alkaloide aus Spigelia zu isolieren und in ihrer Struktur zu bestimmen.

Unsere Untersuchungen zeigten, daß der Alkaloidgehalt der Droge sehr gering ist. Die aus Spigelia hergestellten Alkaloidanreicherungen, das Wasserdampfdestillat DSA und die quartäre Alkaloidfraktion, stellten nur 0.008%, bzw. 0.03% der getrockneten Droge dar.

Das Destillat DSA enthielt als Hauptverbindung Isochinolin (= SA 1). Die ca. 10 fach geringer konzentrierte Substanz SA 2 konnte als Pyridinabkömmling und wahrscheinliches Actinidin-Isomeres charakterisiert werden.

Die quartäre Alkaloidfraktion enthielt als Hauptkomponente Cholin und in geringer Konzentration 3,3-Dimethylacryloylcholin und Benzoylcholin.

Teil II: Funtumia africana (Benth.) Stapf

1. Kenntnisstand über Funtumia africana

1.1. Systematik und Vorkommen

Funtumia gehört innerhalb der Familie der Apocynaceae zur Unterfamilie der Echitoideae. Die Gattung Funtumia umfaßt nur drei Arten, die alle in Afrika beheimatet sind. Neben Funtumia africana (Benth.) Stapf, die vor allem in Zentral- und Westafrika vorkommt, existieren Funtumia latifolia (Stapf) Stapf und Funtumia elastica (Preuss) Stapf. Funtumia africana wird auch unter dem Namen Kichxia africana geführt.

Die Gattung Funtumia zeigt Ähnlichkeiten mit Holarrhena- und Malouetia-Arten. Vor allem das gemeinsame Vorkommen von Steroidalkaloiden bedingt die große Verwandtschaft. Die Gattung Holarrhena, zu der 7 - 8 Arten gehören, zählt zur Unterfamilie der Plumerioideae. Ihr Verbreitungsgebiet umfaßt Asien, hier vor allem Indien, und Afrika (75,76).

1.2. Botanische Beschreibung

Funtumia africana ist ein kleiner Baum von 5 - 8 m Höhe. Die Rinde des Stammes ist glatt und grau, die der Äste dunkel bis schwarz. Die gegenständig angeordneten Blätter sind oval-elliptisch, ganzrandig und von 8 - 15 bikollateralen Nervenbahnen durchzogen. Die weißen Blüten sind in axialen Trugdoldenständen vereinigt. Die 15 mm große Blütenkrone besteht aus 5 miteinander verwachsenen ovalen Blütenblättern. Die 7 - 15 cm langen und 15 - 20 mm breiten schotenförmigen Früchte beinhalten die Samen. Diese sind 12 - 13 mm lang und spindelförmig. An der Spitze tragen sie eine 3 - 4 cm lange Granne, an deren Ende ein Haarschopf sitzt. Der Milchsaft ist weiß und von geringer Qualität (77,78).



Abb. 21:

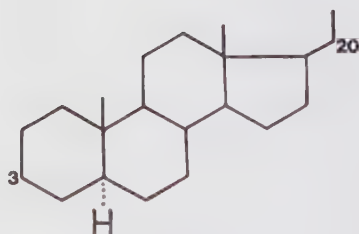
FUNTUMIA AFRICANA

Habituszeichnung aus Hooker's Icones Plantarum,
Tafel 2696 (1901)

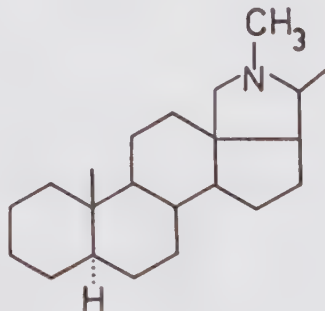
1.3. Bisherige Untersuchungen

Die bisher in Funtumia- und Holarrhena-Arten beschriebenen Steroidalkaloide leiten sich entweder von einfachen Pregnanen (I) mit Stickstofffunktion an C-3 oder/und C-20 oder vom ConaninGrundgerüst (II) ab. Bei den Verbindungen der zweiten Gruppe kann eine zusätzliche Aminierung am C-3 erfolgt sein. Zu den wichtigsten aufgeklärten Verbindungen gehören das Conessin (Conaninderivat) aus Holarrhena anti-dysenterica, das Funtumin (3 α -Amino-5 α -pregnan-20-on) aus Funtumia latifolia und das Holafebrin (20 α -Amino-5-pregnen-3 β -ol) aus Holarrhena febrifuga (79).

Abb 22: Steroidalkaloidgrundgerüste



(I): 5 α -Pregnan



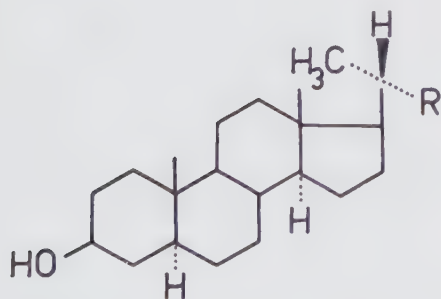
(II): Conanin

Neben den sehr gut untersuchten Holarrhena-Arten und der ebenfalls erforschten Funtumia latifolia ist Funtumia africana bisher Gegenstand nur weniger Untersuchungen gewesen.

JANOT und GOUTAREL (75) fanden einen Gesamtalkaloidgehalt von 1% in den Wurzeln, 0.4% in der Rinde und 1.7% in den Blättern. Näher untersuchten sie die Blätter, aus denen sie 5 Alkaloide isolierten (80).

Funtuphyllamin A, B und C stellen jeweils das 20S-Amino-, -Methylamino- und -Dimethylaminoderivat des 5 α -Pregnan-3 β -ols dar. Die beiden anderen Funtumafrin B und C sind die entsprechenden 3-Keto-Derivate von Funtuphyllamin B und C. Eine phytochemische Untersuchung der Rinde ist bisher nicht durchgeführt worden.

Abb. 23: Bisher aus den Blättern von *Funtumia africana* isolierte Alkaloide



Funtuphyllamin A: R = NH₂

Funtuphyllamin B: R = NHCH₃

Funtuphyllamin C: R = N(CH₃)₂

Funtumafrin B : R = NHCH₃; C-3: C=O

Funtumafrin C : R = N(CH₃)₂; C-3: C=O

1.4. Volksmedizin und Pharmakologie

In der Volksmedizin findet die Wurzel von *Funtumia africana* mit Palmwein vermischt als Mittel gegen Harninkontinenz Anwendung. Ein Puder, hergestellt aus den getrockneten Blättern, dient zur Behandlung von Verbrennungen. Klistiere, die aus der Rinde und den Blättern der Droge bereitet werden, gelten als Mittel gegen Obstipation. Darüberhinaus sollen diese Einläufe die Fruchtbarkeit erhöhen (78,81). Pharmakologische Arbeiten fehlen.

Weit besser untersucht sind die *Holarrhena*-Arten, insbesondere *Holarrhena antidysenterica*. Die Rinde, auch Kurchirinde genannt, wird volksmedizinisch als Mittel gegen Amöbenruhr verwendet (2). Interessant ist die Herz- und Kreislaufwirkung der Droge. Nach i.v. Applikation eines Alkaloidextraktes tritt eine Blutdrucksenkung auf (82). Untersuchungen an Conessin, dem Hauptalkaloid von *Holarrhena antidysenterica*, zeigen nach anfänglicher Blutdrucksteigerung ebenfalls blutdrucksenkende Wirkungen (83). In einer neueren pharmakologischen Arbeit über die Kurchirinde wird von einer starken, dosisabhängigen Verminderung der Herzfrequenz berichtet. Conessin soll hierfür nur teilweise verantwortlich sein (84).

Da die Steroidalkaloide in *Holarrhena antidysenterica* die beschriebenen Herz- und Kreislaufwirkungen bedingen und darüberhinaus Funtumin und Funtumidin, zwei Alkaloide aus *Funtumia latifolia*, blutdrucksenkende und koronardilatierende Eigenschaften besitzen (75), lag es nahe, auch *Funtumia africana* phytochemisch zu untersuchen und auf Herz- und Kreislaufwirkungen zu prüfen.

2. Voruntersuchungen

2.1. Alkaloid-Screening

Für die Voruntersuchungen stellten wir aus 40 g Droge durch Soxhletextraktion einen Methanolauszug her. Dieser wurde nach Einengen mit 1% iger Salzsäure versetzt. Ein Teil davon wurde auf dem Uhrglas mit VALSERS Reagenz geprüft. Es entstand eine positive Reaktion.

Die restliche salzsaure Lösung wurde mit Dichlormethan gewaschen, mit 10% iger Na_2CO_3 -Lösung alkalisiert und mit einem Gemisch von DCM:MeOH 3:2 ausgeschüttelt. Nach Trocknen über Na_2SO_4 wurde eingeengt. Die erneute Prüfung mit VALSERS Reagenz fiel stark positiv aus. Der Rest wurde zur DC-Untersuchung verwendet.

2.2. Vergleichende DC-Untersuchung

Um Anhaltspunkte über die Alkaloidzusammensetzung der *Funtumia africana* Rinde - vor allem im Vergleich zu *Holarrhena antidysenterica* Rinde und *Funtumia africana* Blättern - zu erhalten, stellten wir Alkaloidfraktionen aus 25 g Holarrhenarinde und 135 g Funtumiablättern nach oben beschriebenem Verfahren her.

Für orientierende DC-Untersuchungen verwendeten wir zunächst das von LABLER und CERNY (85) vorgeschlagene Laufmittelsystem Ether/ NH_3 gesättigt.

Dieses System ergab für die Alkaloide der Holarrhenarinde und der Funtumiablätter eine gute Auftrennung, nicht jedoch für die Funtumia-Rindenalkaloide. Aus Abb. 24 ist erkennbar, daß das Inhaltsstoffmuster der Blätter und der Rinde nicht identisch ist. Auch herrscht keine Übereinstimmung mit dem Alkaloidmuster von Holarrhena. In der Holarrhenarinde konnte die Zone mit dem höchsten Rf-Wert durch DC-Vergleich dem Conessin zugeordnet werden.

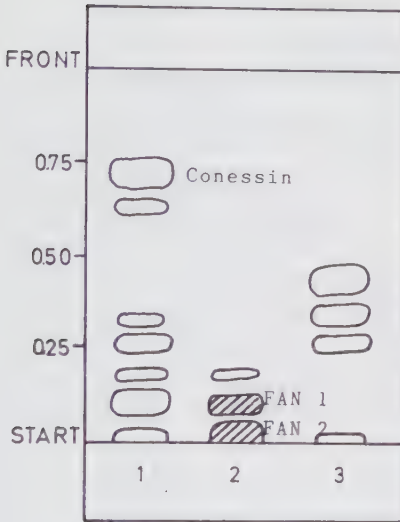
Auf der Suche nach einem zur Trennung der untersuchten Alkaloide brauchbaren Laufmittel entwickelten wir das System CHCl_3 :MeOH 85:15. In diesem Fließmittel blieben die Holarrhena- und Funtumia-Blattalkaloide am Start, während die Funtumia-Rindenalkaloide gut aufgetrennt wurden.

Auffällig waren vor allem 2 Dragendorff positive Zonen mit starker UV-Fluoreszenzminderung im mittleren Rf-Wert Bereich. Bei Holarrhena zeigte sich - allerdings nur bei sehr hohen Auftragemengen - eine schwache UV-Löschung im Bereich der mit FAN 1 bezeichneten Verbindung. Diese ließ sich jedoch nicht mit Dragendorff Reagenz anfärben.

FAN 1 und FAN 2 stellten die mengenmäßig dominierenden Verbindungen in der Rinde von Funtumia africana dar. Da die bisher in Funtumia aufgefundenen Alkaloide keinen Chromophor und somit keine wesentliche UV-Absorption besitzen, sollte es sich bei beiden Substanzen um noch nicht beschriebene Verbindungen handeln. Aus diesen Gründen konzentrierten wir uns auf die Isolierung von FAN 1 und FAN 2.

In der nachfolgenden Abbildung sind die Chromatogramme der Funtumia- und Holarrhena-Extrakte dargestellt.

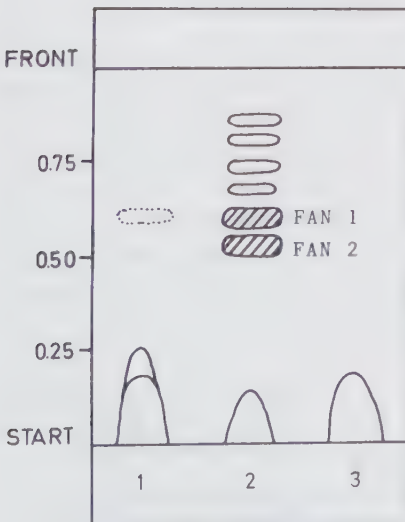
Abb. 24: DC-Skizzen von Funtumia- und Holarrhena-Alkaloidfraktionen



LM: Ether/ NH_3 ges.

Det.: UV 254

Dragendorff



LM: CHCl_3 :MeOH 85:15

Det.: UV 254

Dragendorff

1 = Holarrhena anti-dysenterica

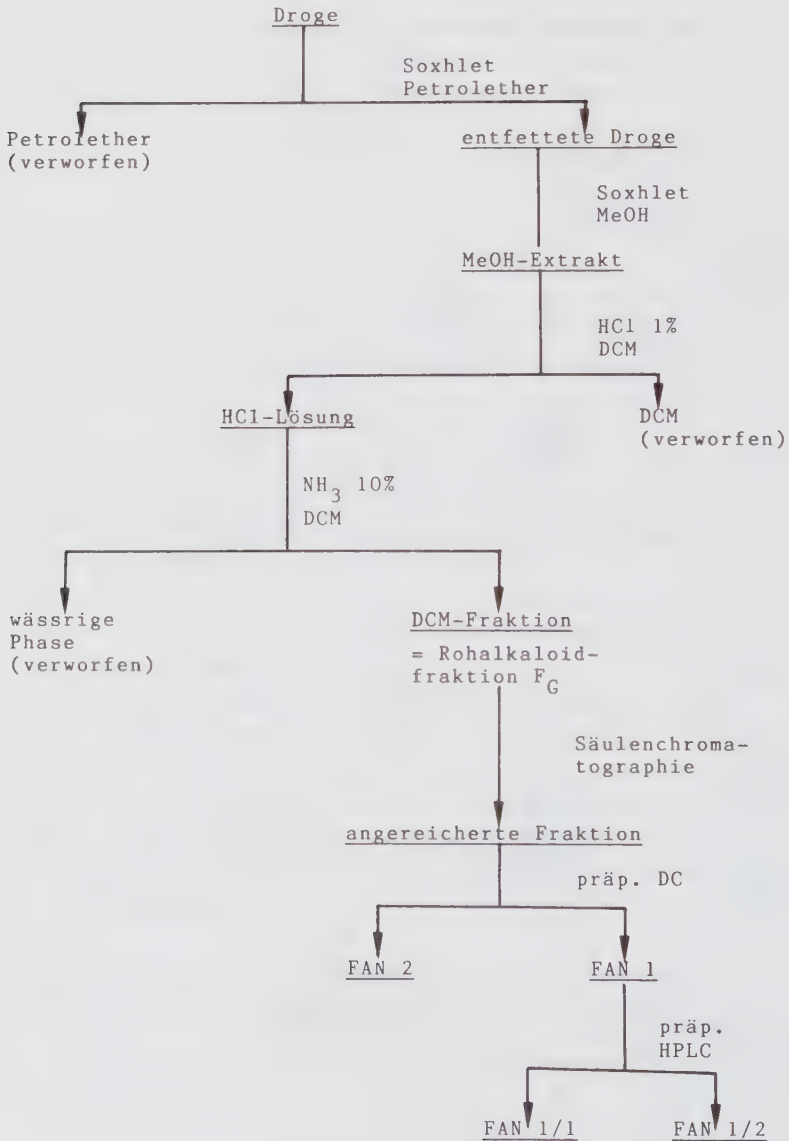
2 = Funtumia africana Rinde

3 = Funtumia africana Blätter

 UV 254 pos.
 Dragendorff pos.

 Dragendorff pos.

Abb. 25: Extraktions- und Isolierungsgang



3. Isolierung

3.1. Extraktbereitung

Für die weiteren Untersuchungen stellten wir aus 600 g pulverisiertem Rindenmaterial von *Funtumia africana* nach Entfetten mit Petrolether durch Soxhletextraktion einen Methanolauszug her. Wir erhielten dabei 50 g Trockenextrakt.

3.2. Anreicherungsverfahren

Zur Abtrennung nicht alkaloidhaltigen Materials führten wir eine Säure-Basenausschüttelung durch. In 3,4% iger Ausbeute erhielten wir die Rohalkaloidfraktion F_G (1,7 g). Eine weitere Aufreinigung gelang durch Säulenchromatographie mit Kieselgel 60 als stationärer Phase und $CHCl_3:MeOH$ 85:15 als Eluens. Es wurden angereicherte Fraktionen von FAN 1 und FAN 2, sowie Mischfraktionen erhalten (Ausbeute der einzelnen Fraktionen, vgl. Exp. Teil IV.6.2.).

3.3. Präparative DC

Die Endreinigung von FAN 1 und FAN 2 erfolgte schließlich durch präparative DC mit Kieselgelfertigplatten der Schichtdicke 0,5 mm. Die durch Säulenchromatographie angereicherten Fraktionen wurden bandenförmig auf die Platten aufgetragen und im Laufmittel $CHCl_3:MeOH$ 85:15 entwickelt. Die Zonen für FAN 1 und FAN 2 wurden im UV 254 markiert, dem Chromatogramm entnommen, mit $DCM:MeOH$ 1:1 eluiert und membranfiltriert. Auf diese Weise konnten wir 17 mg FAN 1 und 10 mg FAN 2 in DC-reiner Form gewinnen.

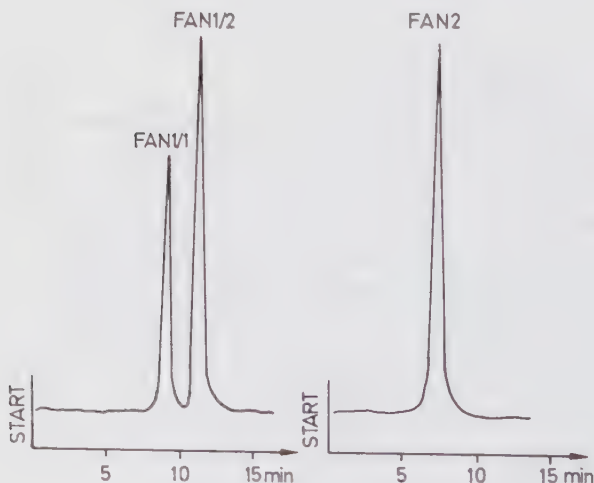
3.4. Analytische HPLC

Zur Reinheitsprüfung der so erhaltenen, dünnschichtchromatographisch einheitlichen Verbindungen führten wir eine analytische HPLC-Bestimmung durch.

Die Trennung erfolgte isokratisch auf einer μ -Bondapak C 18 Säule mit 20% igem Acetonitril unter Zusatz von 2% PIC B7 Reagenz (Fa. Waters). Detektiert wurde mit einem Spektralphotometer im ungefähren UV-Maximum von FAN 1 und FAN 2 bei 240 nm.

Wie Abb. 26 verdeutlicht, lieferte FAN 2 nur einen Peak. FAN 1 dagegen ergab zwei Peaks, die in der Reihenfolge ihrer Elution als FAN 1/1 und FAN 1/2 bezeichnet wurden. Das Verhältnis von FAN 1/1 und FAN 1/2 war je nach eingesetzter Säulenfraktion unterschiedlich. Über die tatsächliche quantitative Zusammensetzung der Hauptalkaloide gab erst eine im Verlauf der weiteren Arbeiten durchgeführte HPLC-Analyse Aufschluß (vgl. 9.2.).

Abb. 26: Analytische HPLC-Trennung der Alkaloide FAN 1 und FAN 2



Geräte- und Trennparameter, siehe Exp. Teil III.3.4.

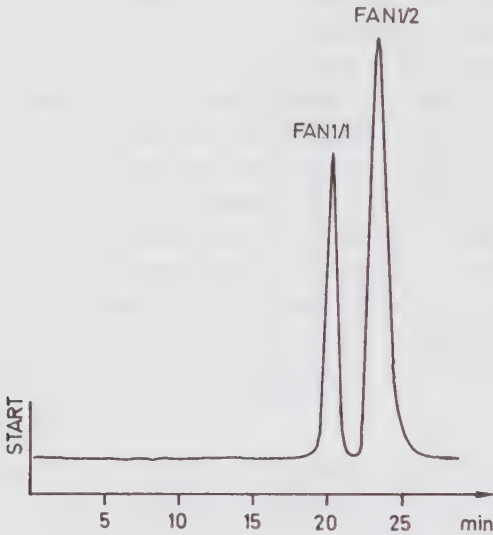
3.5. Präparative HPLC

Für die Reindarstellung von FAN 1/1 und FAN 1/2 blieb somit als Mittel der Wahl die präparative HPLC. Wir variierten zunächst die HPLC-Bedingungen, da der Einsatz des PIC B7 Reagenz im präparativen Maßstab als zu kostspielig erschien. Statt mit Ionenpaarbildner wurde die HPLC-Trennung unter Verwendung eines Basenzusatzes vorgenommen. Diese Zugabe dient dem Zurückdrängen der Dissoziation von Alkaloiden im wässrigen Milieu. Sie führte zu klar zonierten Peaks, wie sie durch reine Acetonitril-Wassermischungen nicht erreicht werden konnten. Der wässrigen Phase wurden deshalb 10 mMol $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ zugesetzt. Gleichzeitig verbesserten wir das Laufmittelsystem durch Erhöhung des Acetonitrilanteils auf 29%, um so akzeptable Analysenzeiten zu erhalten.

Wir stellten 0.5 - 1% ige Lösungen des FAN 1 Gemisches in Acetonitril her, die in zahlreichen Durchgängen auf einer semipräparativen μ -Bondapak C 18 Säule aufgetrennt wurden. Pro Analyse konnten dabei 0.5 mg Substanzgemisch in einem Zeitraum von 40 Minuten chromatographiert werden. Größere Injektionsmengen waren nicht geeignet, da hierbei Peaküberlappungen auftraten.

Wir fingen die Peaks auf und zogen das Acetonitril am Rotationsverdampfer ab. Die verbleibenden wässrigen Phasen wurden je 5 mal mit Dichlormethan ausgeschüttelt. Auf diese Weise konnten wir ausgehend von 13 mg eingesetztem Gemisch 4 mg FAN 1/1 und 6 mg FAN 1/2 in reiner Form gewinnen.

Abb. 27: HPLC-Chromatogramm zur präparativen Trennung von FAN 1/1 und FAN 1/2



Geräte- und Trennparameter, siehe Exp. Teil III.3.5.

4. Orientierende dünnschichtchromatographische Untersuchungen zur Strukturaufklärung

Erste Hinweise auf die Strukturen der Alkaloide FAN 1/1, FAN 1/2 und FAN 2 erhielten wir durch verschiedene auf der DC-Platte durchgeführte Farbreaktionen. Da sämtliche bisher in Funtumia-Arten gefundenen Alkaloide Steroide darstellen, prüften wir zunächst auf das Vorliegen dieser Grundstruktur.

In der Literatur werden zahlreiche Detektionsreagenzien beschrieben, die mit Steroiden mehr oder weniger charakteristische Färbungen ergeben. SCHREIBER (86) benutzte Cer-(IV)-sulfat in 65% iger H_2SO_4 zum Nachweis der Steroide in Solanum-Arten. Dieses Reagenz soll eine gewisse Spezifität für Steroidalkaloide besitzen; stickstofflose Verbindungen reagieren weniger gut. BOLL (87) verwendete zur Detektion der Solanumalkaloide eine 25% ige Antimon-(III)-chlorid-Lösung in Chloroform (Carr-Price Reagenz). Damit war je nach auftretender Färbung eine Unterscheidung zwischen gesättigten (grau-violett) und ungesättigten (rot-violett) Verbindungen möglich. Weiterhin finden Essigsäureanhydrid- H_2SO_4 (Liebermann-Burchards Reagenz (28)) und Vanillin- H_2SO_4 (Godin Reagenz (88)) beim dünnschichtchromatographischen Nachweis von Steroiden Anwendung.

Tabelle 5: Detektionsverhalten der Funtumia-Alkaloide

		FAN 1/1	FAN 1/2	FAN 2
Vanillin- H_2SO_4	vis	braun	braun	braun
	UV	-	-	-
SbCl ₃	vis	gelblich	gelblich	gelblich
	UV	rötlich	rötlich	rötlich
Cer-(IV)- sulfat	vis	braun/gelb	braun/gelb	braun/gelb
	UV	rot/braun	rot/braun	rot/braun
Acetanhydrid- H_2SO_4	vis	braun	braun	braun
	UV	rot/braun	hellrot	hellrot

Wie aus Tabelle 5 hervorgeht, zeigten alle isolierten Verbindungen mit den Steroid-Detektionsreagenzien positive Reaktionen. Das Steroidgrundgerüst der in Funtumia nachgewiesenen Substanzen galt somit als wahrscheinlich.

Nach BOLL (87) läßt die rötliche Färbung nach Antimon-(III)-chlorid Behandlung das Vorliegen einer ungesättigten Struktur vermuten. Dafür sprachen auch die UV-Minderungen, die die Substanzen auf Kieselgelfertigplatten mit Fluoreszenzindikator gaben. Es sollte daher mindestens eine konjugierte Doppelbindung im Molekül enthalten sein.

Da in Steroiden solche Strukturelemente durch α/β -ungesättigte Carbonylgruppen bedingt sein können (vgl. z.B. Progesteron), prüften wir ebenfalls auf der DC-Platte durch Besprühen mit einer salzsauren 2,4-Dinitrophenylhydrazin-Lösung auf das Vorhandensein einer Ketogruppe. Alle drei Verbindungen reagierten unter Gelbfärbung.

Da sich beim Nachbesprühen mit Kaliumhexacyanoferrat-(III)-Lösung keine Farbveränderungen ergaben, wie es bei gesättigten Keto- und Aldehydgruppen der Fall ist (89), sollte in FAN 1/1, FAN 1/2 und FAN 2 eine α/β -ungesättigte Carbonylgruppe vorliegen.

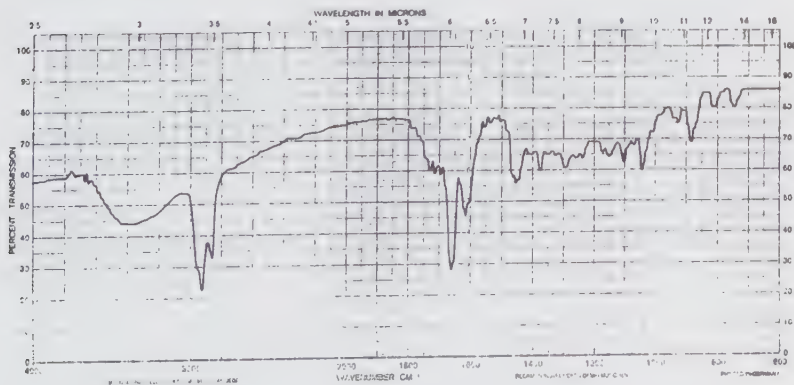
5. Strukturaufklärung von Verbindung FAN 1/1

5.1. UV- und IR-Spektren

Substanz FAN 1/1 wurde in Form eines weißen Pulvers vom Schmelzpunkt 110°C erhalten. Ein hochaufgelöstes Massenspektrum ergab das Molekulargewicht 325.20417, entsprechend der Summenformel $\text{C}_{21}\text{H}_{27}\text{NO}_2$. Dies stand in Übereinstimmung mit einer durchgeführten CHN-Analyse (vgl. Exp. Teil IV.6.8.).

Das UV-Spektrum zeigte ein Maximum bei $\lambda = 244.5\text{ nm}$ und lag damit im Bereich von gekreuzt konjugierten 1,4-Dien-3-Keto-Steroiden (90). Durch das IR-Spektrum wurde dieses Strukturelement bestätigt. Im Carbonylbereich trat bei 1660 cm^{-1} , 1615 cm^{-1} und 1600 cm^{-1} ein Triplett auf, dessen Banden mit kleineren Wellenzahlen abnehmende Intensitäten zeigten. Für ein einfach konjugiertes Keton läge die der $\text{C}=\text{O}$ -Valenzschwingung zugehörige Bande mit 1660 cm^{-1} um ca. 20 cm^{-1} zu niedrig (91). Zusätzlich war bei 3200 cm^{-1} eine breite OH-Bande zu beobachten.

Abb. 28: IR-Spektrum von Verbindung FAN 1/1



5.2. Massenspektrometrie

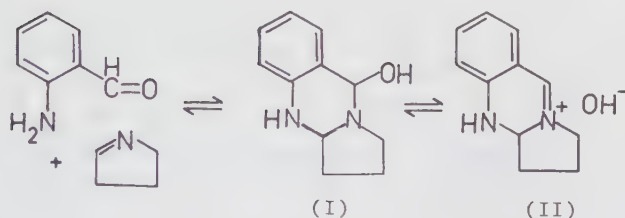
Die Massenspektrometrie liefert wichtige Hinweise auf die Struktur von Steroidalkaloiden (92,93). Mit ihrer Hilfe können Position und Substitution der Stickstoffgruppierung eindeutig festgelegt werden.

So zeigen Steroidalkaloide vom α -Pregnantyp mit Stickstofffunktion an C-3 zwei charakteristische Fragmente bei m/e 54 + R + R' und m/e 80 + R + R', wobei R und R' die Stickstoff-Substituenten (CH_3 oder H) bezeichnen. 20-Aminopregnane liefern den Basispeak bei m/e 42 + R + R', d.h. je nachdem ob eine primäre, sekundäre oder tertiäre Aminogruppe vorliegt, bei m/e 44, 58 oder 72. Steroide, die im Ring E eine Pyrrolidinstruktur besitzen, d.h. sich vom Conaningerüst ableiten, sind gekennzeichnet durch eine starke $M^+ - 15$ Abspaltung und ein weiteres Signal bei m/e 56 + R, wobei R wieder den Stickstoff-Substituenten darstellt.

Im Massenspektrum von FAN 1/1 fehlten die für eine 3- oder 20-Aminopregnanstruktur typischen Signale. Auch Fragmentierungen, die für das Vorliegen einer Pyrrolidinstruktur sprechen würden, waren nicht vorhanden. Dafür trat bei m/e 55 ein Peak auf, der das Vorhandensein einer Δ^1 -Pyrrolinstruktur anzeigte (93).

Da Fragmentionen in diesem Bereich nicht sehr charakteristisch sind, wurde mit einer von SCHÖPF et al. (94) beschriebenen Methode auf das Vorliegen einer Δ^1 -Pyrrolinstruktur geprüft. Δ^1 -Pyrroline reagieren mit o-Aminobenzaldehyd zu einem Zwischenprodukt (I), das mit dem entsprechenden Dihydrochinazolinium-Derivat (II) im Gleichgewicht steht (vgl. Abb. 29). Die bei Umsetzung eines FAN 1 Gemisches entstandene orange gefärbte Verbindung und deren Ausfällbarkeit mit Pikrinsäure deuteten auf das Vorhandensein einer Δ^1 -Pyrrolinstruktur hin.

Abb 29: Umsetzung von Δ^1 -Pyrrolin mit o-Aminobenzaldehyd



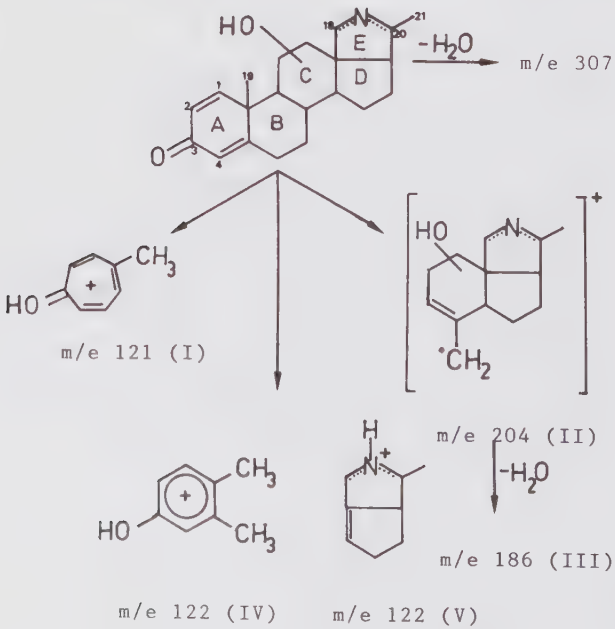
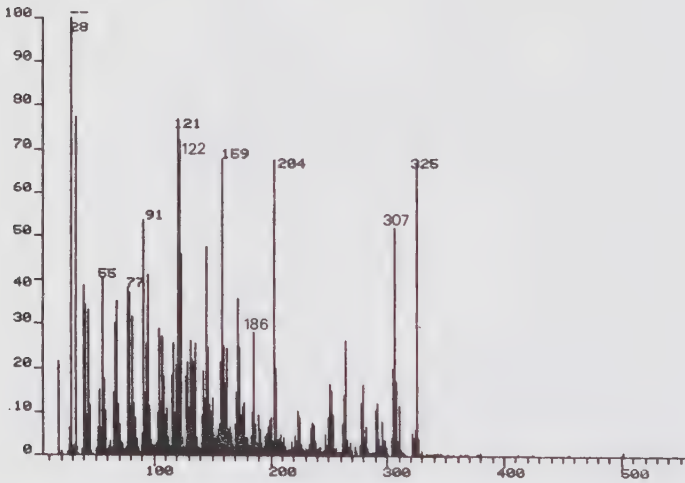
In Übereinstimmung mit den UV- und IR-Daten konnte somit für den Steroidgrundkörper ein Norcona-N(?),1,4-trienin-3-on Gerüst angenommen werden, wobei zunächst die genaue Lokalisation der Doppelbindung im Heteroring offenbleiben mußte.

Die Hauptfragmentionen von FAN 1/1 standen in Einklang mit dieser Struktur (vgl. Abb. 30).

Der Molekülpeak lag bei m/e 325. Der Basispeak bei m/e 121 (I) bestätigte die geforderte 1,4-Dien-3-on Struktur (95). Das Ion bei m/e 122 setzt sich laut Literaturangaben aus den Bruchstücken (IV) und (V) zusammen (96). Bei Spaltung im Ring B entsteht bei Hydroxylsubstitution in den Ringen C, D oder E das Fragmention m/e 204 (II), aus dem durch Wasserabspaltung m/e 186 (III) erhalten wird. Das Vorhandensein einer Hydroxylgruppe zeigte auch die Wasserabspaltung aus dem Molekülion an (m/e 307).

Die nachfolgende Abbildung gibt das Massenspektrum und Fragmentierungsschema für das Alkaloid FAN 1/1 wieder.

Abb. 30: Massenspektrum von FAN 1/1 und
Fragmentierungsschema



5.3. ^1H -NMR-Spektroskopie

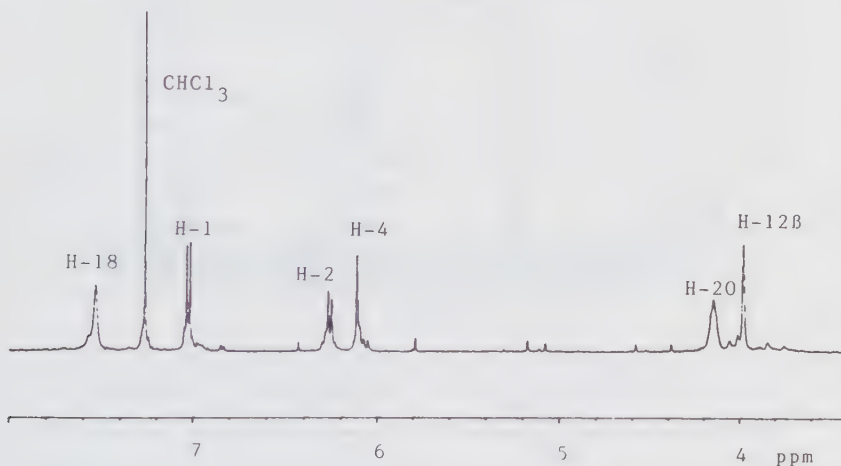
Die endgültige Bestimmung der Struktur erfolgte durch die ^1H -NMR-Spektroskopie. Abb. 31 zeigt ein bei 500 MHz in CDCl_3 aufgenommenes Spektrum der Verbindung FAN 1/1.

Im Bereich der Steroidgerüstprotonen waren deutlich zwei Methylgruppen zu sehen. Die eine erschien als scharfes Singulett bei 1.25 ppm und war der angulären C-19 Methylgruppe zuzuordnen. Die zweite Methylgruppe, deren Resonanzfrequenz bei 1.39 ppm lag, spaltete in ein Dublett mit $J = 7$ Hz auf. Es handelte sich hierbei um die C-21 Methylgruppe. Aufgrund der beobachteten vicinalen Kopplung stand fest, daß C-20 ein Proton tragen mußte. Somit war sicher, daß die Doppelbindung im Heteroring zwischen dem C-18 und dem N lokalisiert sein mußte. Das geforderte olefinische Proton des Strukturelements $\text{R}-\text{HC}=\text{N}-\text{CH}-\text{R}'$ erschien bei 7.53 ppm. Die Signalverbreiterung rührte von einer long-range Kopplung zum H-20 Proton her, wie sie auch in anderen Δ^1 -Pyrrolin-Derivaten beobachtet wird (91,97,98).

Im olefinischen Bereich des Spektrums lagen die Resonanzen für die drei Protonen des A-Ringes. Das H-1 Proton erschien bei 7.05 ppm als Dublett mit $J = 10.1$ Hz. Diese Kopplungsgröße liegt im Bereich der cis-Kopplungen von Olefinen (99). Der zugehörige Kopplungspartner H-2 trat bei 6.26 ppm auf und zeigte zusätzlich eine Kopplung von 2 Hz zum H-4 Proton. Das Proton an C-4 schließlich erschien bei 6.11 ppm als Dublett ($J = 2$ Hz). Die long-range Kopplungen konnten dem Spektrum nur andeutungsweise entnommen werden; deutlicher waren sie im 200 MHz Spektrum mit $\text{DMSO}-d_6$ als Lösungsmittel zu sehen (vgl. Abb. 33). Die gefundenen Resonanzlagen stimmten gut mit den Literaturwerten für andere 1,4-Dien-3-one überein (91,96, 100).

Bei 4.15 ppm trat ein breites Multiplett auf, das aufgrund der starken Entschirmung dem Proton an C-20 zugeordnet werden konnte. Das Signal bei 3.98 ppm rührte von dem geminal zur Hydroxylgruppe stehenden Proton her. Die übrigen Gerüstprotonen lagen im Bereich zwischen 1.5 und 2.5 ppm.

Abb. 32: Ausschnitt aus dem 500 MHz ^1H -NMR-Spektrum von FAN 1/1



5.4. Bestimmung von Lage und Konfiguration der OH-Gruppe

Schließlich galt es noch, die genaue Position und Konfiguration der OH-Gruppe in FAN 1/1 festzulegen. In Steroidalkaloiden sind bisher Hydroxylierungen an C-2, C-4, C-11, C-12 und C-16 beobachtet worden (76).

Das im Massenspektrum von FAN 1/1 bei m/e 204 registrierte Fragmentation sprach für das Vorliegen der Hydroxylgruppe in den Ringen C, D oder E. Durch ^1H -NMR-Untersuchungen gelang es, die Stellung der Hydroxylgruppe als $12\alpha\text{-OH}$ zu bestimmen.

5.4.1. ^1H -NMR-Spektrum von FAN 1/1 in CDCl_3

Im 500 MHz ^1H -NMR-Spektrum (vgl. Abb. 31) in CDCl_3 erschien das geminal zur Hydroxylgruppe stehende Proton bei 3.98 ppm; es sollte sich somit um eine sekundäre OH-Gruppe handeln. Das Signal war nicht aufgelöst, so daß das Kopplungsmuster nur indirekt aufgrund der Halbwertbreite von ~ 5 Hz bestimmt werden konnte. Diese geringe Aufspaltung des Signals legt zwei Schlüsse nahe:

- Es sollten höchstens zwei vicinale Kopplungspartner vorhanden sein, da sonst immer komplexere Spinsysteme zu erwarten sind.
- Die Hydroxylgruppe sollte axial angeordnet sein. In diesem Fall halbiert das geminal zur OH-Gruppe stehende Proton den Winkel der vicinalen Methylenprotonen (Diederwinkel $\sim 60^\circ$), so daß annähernd gleiche Kopplungskonstanten resultieren. Die axiale OH-Gruppe reduziert die entsprechend der KARPLUS-Gleichung (101) errechneten Kopplungsgrößen (~ 5 Hz) auf 2 Hz (102).

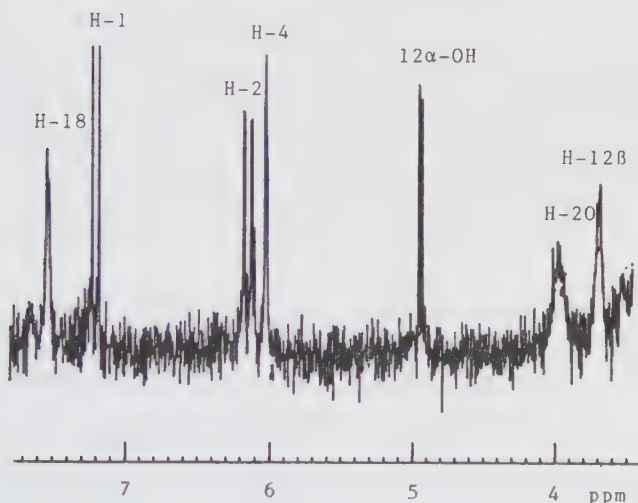
Dies ist in guter Übereinstimmung mit dem relativ scharfen Signal bei 3.98 ppm. Bei Vorliegen einer axial-äquatorialen und axial-axialen Kopplung müßte die ermittelte Halbwertbreite ca. 15 Hz betragen. (102). Nur die Anordnung der Hydroxylgruppe in 12 α -Position erfüllt die aufgrund der Signalform postulierten Bedingungen.

5.4.2. ^1H -NMR-Spektrum von FAN 1/1 in DMSO-d_6

Da das OH-Signal im CDCl_3 -Spektrum wegen des in diesem Lösungsmittel stets auftretenden intermolekularen Protonenaustausches nicht registriert wurde, nahmen wir ein Spektrum der Verbindung in DMSO-d_6 bei 200 MHz auf (vgl. Abb. 33).

In diesem Lösungsmittel ist der Protonenaustausch so herabgesetzt, daß Spin-Spin-Wechselwirkungen der OH-Gruppe mit dem benachbarten Proton beobachtet werden können.

Abb. 33: Ausschnitt aus dem 200 MHz ^1H -NMR-Spektrum von FAN 1/1 in DMSO-d_6



Das Hydroxylproton erschien entsprechend seinem Charakter als sekundärer Alkohol bei 4.94 ppm als Dublett. Die Kopplungskonstante $J = 4$ Hz lag in dem für axiale OH-Protonen typischen Bereich (103). Nach D_2O -Austausch verschwand das Signal. Das zur OH-Gruppe geminale Proton trat bei 3.68 ppm in Resonanz. Neben der Kopplung von 4 Hz war nun auch die Kopplung von 2 Hz auszumachen, die dem Wert für eine axial-äquatoriale, bzw. äquatorial-äquatoriale Kopplung mit den Protonen an C-11 entsprach.

5.4.3. Vergleich der ^1H -NMR-Resonanzlagen für CH_3
und CH-OH mit Literaturwerten

Die Hydroxylgruppe war aufgrund der vorhergehenden Untersuchungen bereits eindeutig als $12\alpha\text{-OH}$ festgelegt. Dies wurde im folgenden durch Vergleich mit den Literaturdaten für die Verschiebung des CH-OH Protons und der C-19 Methylgruppe in Steroiden bestätigt.

Im ^1H -NMR-Spektrum ist die Resonanzlage von Protonen, die am gleichen C-Atom wie die Hydroxylgruppe lokalisiert sind, charakteristisch für die Lage und Konfiguration der OH-Gruppe. Voraussetzung ist, daß keine weiteren Substituenten, die die Verschiebung beeinflussen, vorhanden sind. SMITH (104) veröffentlichte eine tabellarische Übersicht der Protonenresonanzlagen.

Tabelle 6: Beeinflussung der Protonenresonanzen durch OH-Substitution in CDCl_3 (nach SMITH (104))

Position der OH-Gruppe	Resonanzlage des geminalen Protons
11 α	3.68 - 4.05 ppm
11 β	4.34 - 4.61 ppm
12 α	3.88 - 4.41 ppm
12 β	3.39 - 3.71 ppm
15 α	4.10 ppm
15 β	4.28 - 4.35 ppm
16 α	3.94 - 4.83 ppm

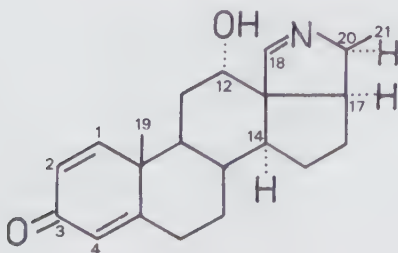
Die Resonanzlage des 12 β -Protons in FAN 1/1 stimmt gut mit den Literaturwerten überein. Die ebenfalls in diesem Bereich erscheinenden 11 β - und 16 β -Protonen scheiden aus, da aufgrund ihrer Umgebung komplexere Spinsysteme zu erwarten sind.

Eine weitere Bestätigung erhielten wir durch den Verschiebungswert der angulären C-19 Methylgruppe. SHOOLERY und RODGERS (105) zeigten als erste, daß die Resonanzfrequenzen der C-18 und C-19 Methylgruppen in Steroiden von Art und Stellung weiterer Substituenten abhängig sind. Die Verschiebungsbeiträge der einzelnen Substituenten verhalten sich dabei additiv. ZÜRCHER (106) prüfte und erweiterte diese Regel anhand einer Vielzahl von Steroiden. Mit Hilfe der von ihm postulierten Resonanzlagen für die C-18 und C-19 Methylgruppen ist es in vielen Fällen möglich, die Substitutionsverhältnisse in Steroiden zu klären.

Für Verbindung FAN 1/1 lag die rechnerisch ermittelte Resonanzlage der C-19 Methylgruppe bei vorliegender 12 α -OH Substitution bei 1.24 ppm. Dieser Wert ist in guter Übereinstimmung mit der tatsächlichen Verschiebung von 1.25 ppm.

Die Struktur von FAN 1/1 konnte somit eindeutig als 12 α -Hydroxy-norcona-N(18),1,4-trienin-3-on bestimmt werden. Die Verbindung ist bisher nicht beschrieben worden.

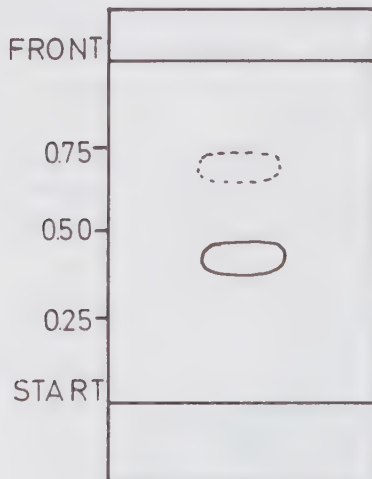
Abb. 34: Verbindung FAN 1/1



5.5. Darstellung des FAN 1/1-Diacetates

Durch Umsetzen von FAN 1/1 mit Acetanhydrid/Pyridin stellen wir das entsprechende Diacetat her. Das Reaktionsprodukt war nicht einheitlich. Neben dem Diacetat entstand noch eine lipophilere Verbindung, die vermutlich das Triacetat darstellte. Das Auftreten von Nebenprodukten bei der Acetylierung von Δ^1 -Pyrrolin-Steroiden war bereits von EINHORN et al. (107) beobachtet worden. Durch präparative DC isolierten wir das Diacetat nach der üblichen Methode. Die Identität wurde durch ein Massenspektrum, das den Molekülpeak M^+ bei 427 und typische Acetatabspaltungen von 60 und 42 Masseneinheiten zeigte, bewiesen.

Abb. 35: DC-Bild von FAN 1/1 nach Acetylierung



LM: $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}$

20 : 1

Det.: UV 254

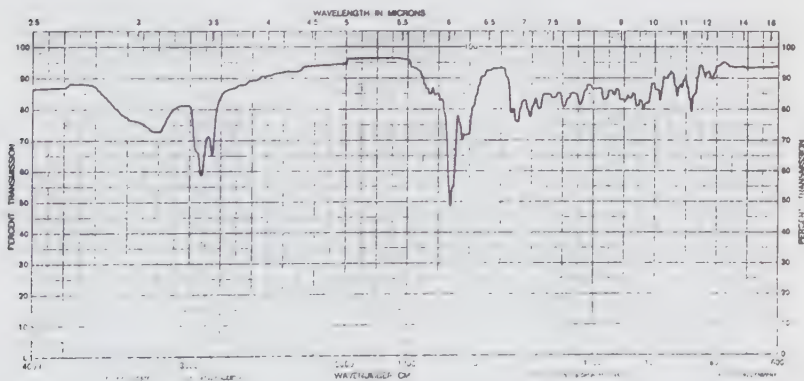
6. Strukturaufklärung von Verbindung FAN 1/2

6.1. Bewertung von IR, MS und UV

Die Verbindung FAN 1/2 hatte einen Schmelzpunkt von 210 - 215°C. Durch ein hochaufgelöstes Massenspektrum wurde das Molekulargewicht mit 325.20417 bestimmt. Daraus leitete sich die Summenformel $C_{21}H_{27}NO_2$ ab.

Das IR-Spektrum zeigte große Ähnlichkeit mit demjenigen von FAN 1/1: neben der breiten OH-Bande bei 3200 cm^{-1} traten die Banden eines doppelt konjugierten Ketons mit Werten von 1665 cm^{-1} , 1625 cm^{-1} und 1600 cm^{-1} auf.

Abb. 36: IR-Spektrum von Verbindung FAN 1/2

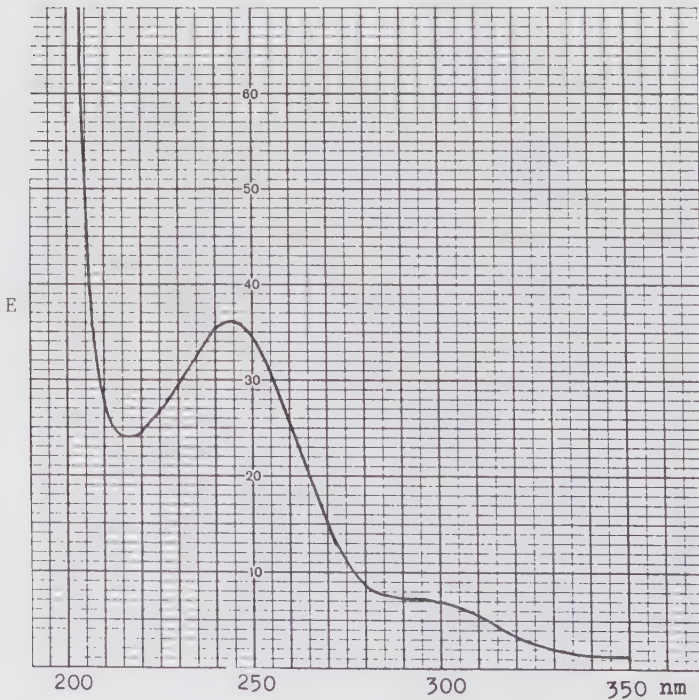


Große Übereinstimmung mit FAN 1/1 wies auch das Massenspektrum der Verbindung auf. Neben dem Fragmentation m/e 121/122, das die Dienon-Struktur kennzeichnete, traten weitere charakteristische Peaks bei m/e 307 ($M^+ - 18$) und m/e 55 (Δ^1 -Pyrrolinring) auf.

Das Bruchstück bei m/e 204 deutete wie schon in Verbindung FAN 1/1 auf das Vorliegen einer Hydroxylgruppe in den Ringen C, D oder E hin. Es war zu vermuten, daß es sich bei FAN 1/1 und FAN 1/2 um Isomere handelte, die sich lediglich in der Lage der Hydroxylgruppe unterscheiden sollten. Darauf deutete auch das identische Verhalten in der Dünnschichtchromatographie hin.

Unterschiede zeigte das UV-Spektrum, dessen Maximum bei 246 nm lag und im Vergleich zu FAN 1/1 geringfügig um ca. 2 nm bathochrom verschoben war.

Abb. 37: UV-Spektrum von FAN 1/2



6.2. ^1H -NMR-Spektren von FAN 1/2

Das 500 MHz ^1H -NMR-Spektrum der Verbindung in CDCl_3 ist in Abbildung 38 dargestellt.

Bei 1.38 ppm erschien das Singulett der C-19 Methylgruppe, dem durch zufällige Isochronie das Dublett der C-21 Methylgruppe überlagert war. Das H-18 Proton trat bei 7.50 ppm in Resonanz. Im olefinischen Bereich lagen die für die Dienon-Gruppierung typischen Signale der H-1 ($\delta = 7.80$ ppm), H-2 ($\delta = 6.19$ ppm) und H-4 ($\delta = 6.13$ ppm) Protonen. Sie zeigten die gleichen Aufspaltungen, die schon in FAN 1/1 beobachtet worden waren. Auffällig war die paramagnetische Verschiebung des H-1 Protons, während die Resonanzlagen der H-2 und H-4 Protonen in guter Übereinstimmung mit den Werten für FAN 1/1 standen.

Das Multiplett bei 4.1 ppm integrierte für zwei Protonen, so daß zu vermuten war, daß in diesem Bereich neben dem H-20 Proton auch das geminal zur OH-Gruppe stehende Proton in Resonanz trat. Die OH-Gruppe selbst konnte im Spektrum nicht registriert werden.

Ein ^1H -NMR-Spektrum, das bei 80 MHz in DMSO-d_6 aufgenommen wurde (vgl. Abb. 39), bestätigte das Vorliegen einer sekundären OH-Gruppe. Bei 4.9 ppm trat ein zusätzliches Dublett im Spektrum auf. Die Kopplungskonstante von 6 Hz wies auf eine äquatoriale Anordnung des Hydroxyls hin. Nach D_2O -Austausch verschwand das Signal bei 4.9 ppm unter gleichzeitiger Verschärfung des Multipletts bei 4 ppm.

In DMSO-d_6 erschienen die Signale der C-19 und C-21 Methylgruppen getrennt mit Werten von $\delta = 1.35$ ppm und $\delta = 1.28$ ppm. Letztere zeigte neben der vicinalen Kopplung von 7 Hz mit dem H-20 Proton noch einen J-Wert von 2 Hz, der eventuell durch eine long-range Wechselwirkung mit H-17 bedingt ist (108).

Abb. 38: 500 MHz ^1H -NMR-Spektrum von FAN 1/2 in CDCl_3

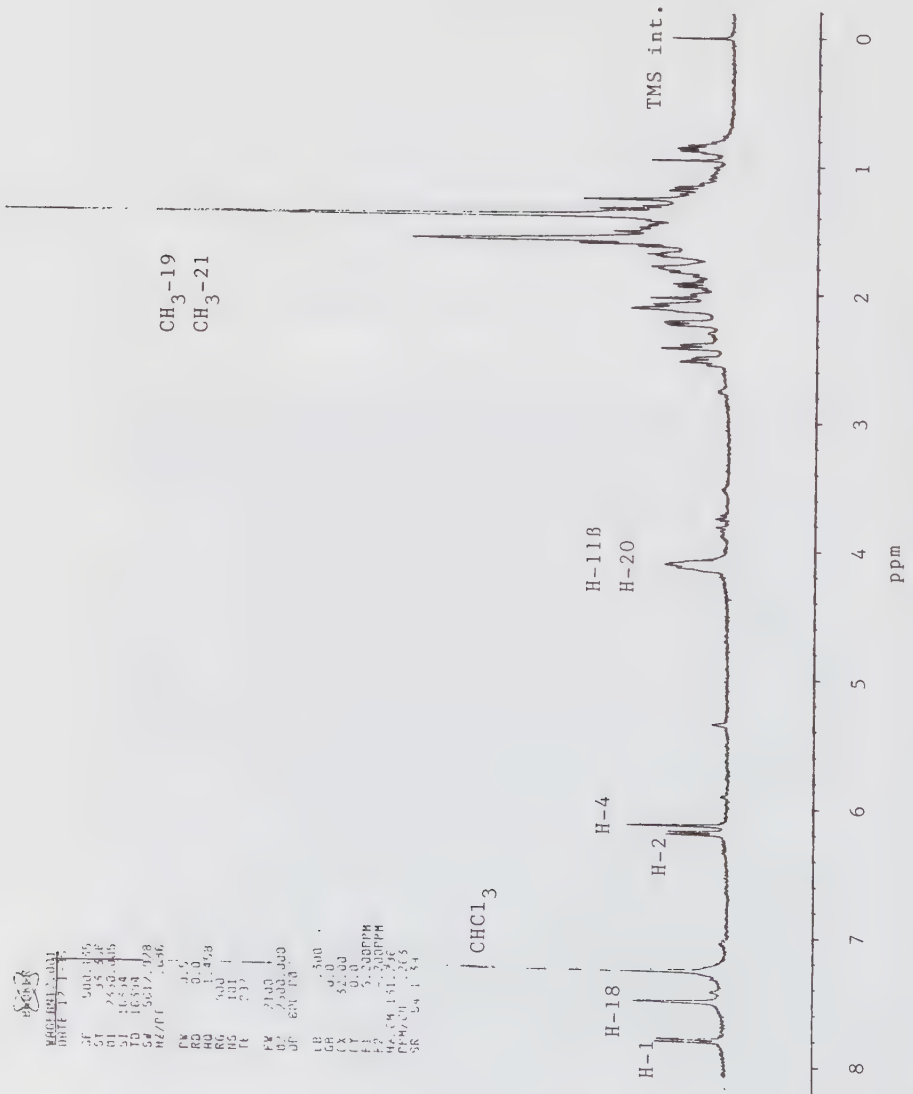
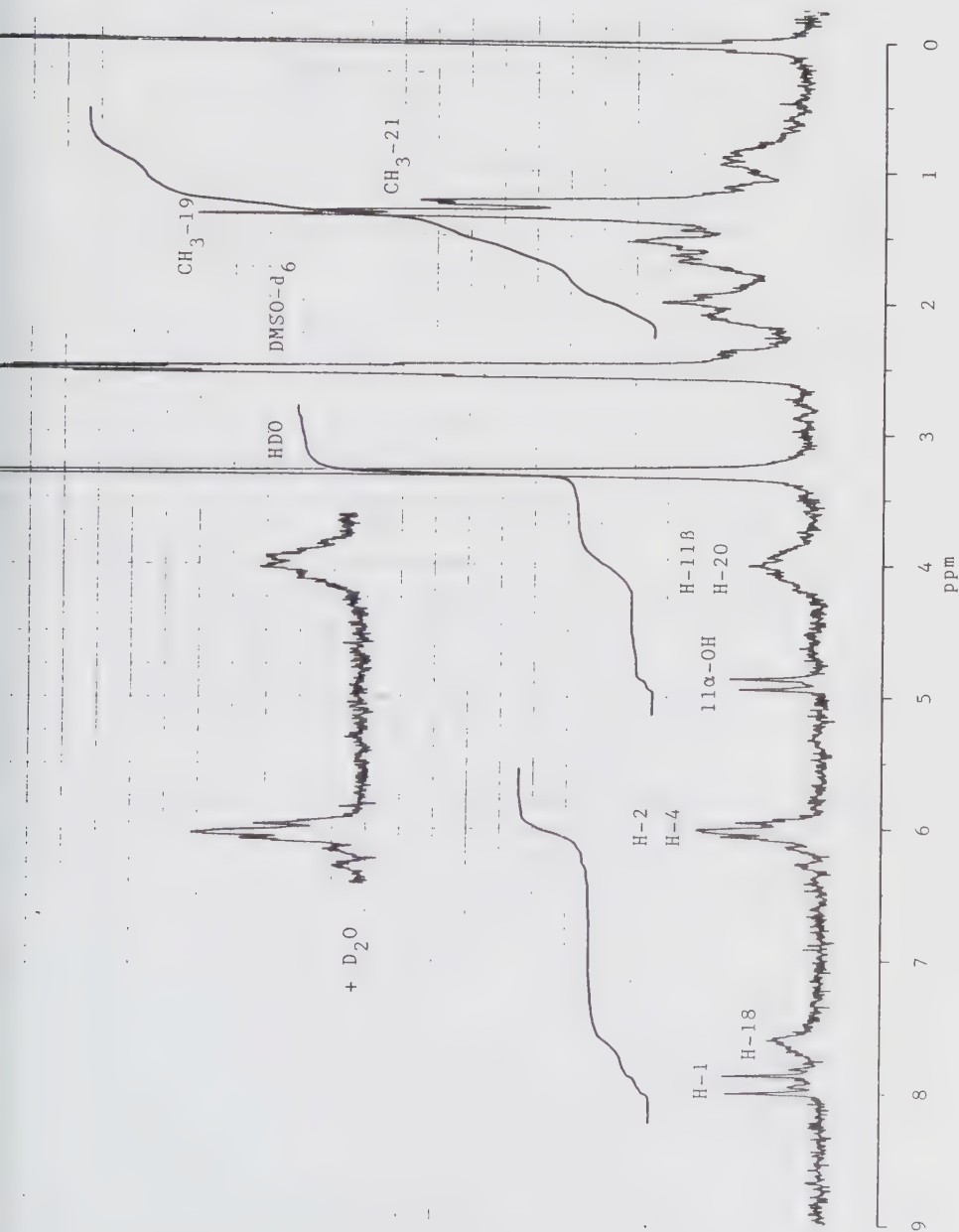


Abb. 39: 80 MHz ^1H -NMR-Spektrum von FAN 1/2 in DMSO-d_6



Die Tieffeld-Verschiebung des H-1 Signals sowohl im CDCl_3 - als auch im DMSO-d_6 -Spektrum ist typisch für das Vorliegen eines $11\alpha\text{-OH}$ Substituenten (91). Diese Abweichung kann laut SNATZKE (91) durch die Ausbildung einer Wasserstoffbrückenbindung zwischen der $11\alpha\text{-OH}$ -Gruppe und den π -Elektronen der Doppelbindung am C-1 zustandekommen. Damit läßt sich auch die längerwellige Verschiebung des UV-Maximums erklären. Die Resonanzlage der C-19 Methylgruppe stand ebenfalls in Einklang mit einer $11\alpha\text{-OH}$ Substitution.

Demnach handelt es sich bei der Substanz FAN 1/2 um das $11\alpha\text{-Hydroxy-norcona-N(18),1,4\text{-trienin-3-on}$.

Die Struktur von FAN 1/2 ist identisch mit der des Holonamin, das von TSCHESCHE (91) in sehr geringen Mengen aus der Rinde von *Holarrhena antidysenterica* isoliert wurde.

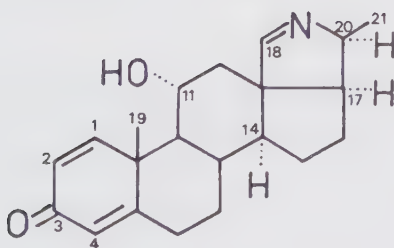
Ein Vergleich der UV-, IR-, $^1\text{H-NMR}$ - und CD-Spektren (vgl. auch 8.2.) von FAN 1/2 mit den Literaturwerten von Holonamin zeigte gute Übereinstimmung. In der nachfolgenden Tabelle sind die Verschiebungslagen von Holonamin und FAN 1/2 im $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum abgebildet.

Für die mit einem * gekennzeichneten Protonen existieren keine Angaben für Holonamin. (91).

Tabelle 7: Vergleich der ^1H -NMR-Werte von Verbindung FAN 1/2 und Holonamin in CDCl_3 (ppm)

	<u>Holonamin</u>	<u>FAN 1/2</u>
H-1	7.94	7.80
H-18	7.50	7.50
H-2	6.11	6.19
H-4	-*	6.13
H-20	-*	4.1
H-11B	-*	4.1
CH_3 -19	1.38	1.38
CH_3 -21	1.38	1.38

Abb. 40: Verbindung FAN 1/2



7. Strukturaufklärung von Verbindung FAN 2

7.1. Festlegung des Grundgerüsts

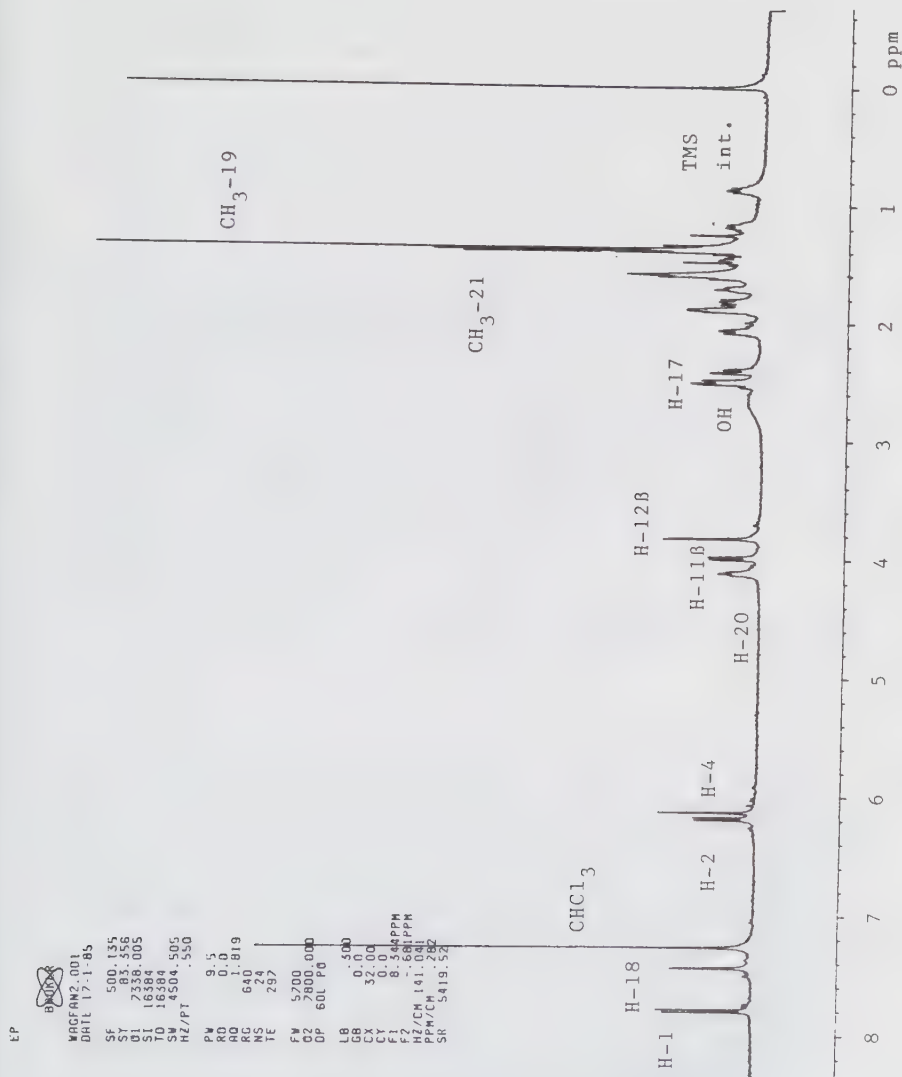
Die Substanz FAN 2 wurde als weißes amorphes Pulver vom Schmelzpunkt 240 - 245°C erhalten. Ein hochaufgelöstes Massenspektrum der Verbindung lieferte den Molekülpeak bei m/e 341. Das genaue Molekulargewicht wurde mit 341.199082 angegeben. Dies entsprach der Summenformel $C_{21}H_{27}NO_3$. Im Einklang damit stand das Ergebnis der Elementaranalyse (vgl. Exp. Teil IV.6.8.).

Das UV-Spektrum zeigte das für 1,4-Dien-3-Ketone typische Absorptionsmaximum bei 246.5 nm. Das 500 MHz 1H -NMR-Spektrum ergab die für das Norcona-N(18),1,4-trienin-3-on Gerüst charakteristischen Signale (vgl. Abb. 41).

So konnte die Resonanzlage der angulären C-19 Methylgruppe dem Singulett bei 1.37 ppm, die der sekundären C-21 Methylgruppe dem Dublett bei 1.38 ppm zugeordnet werden. Bei 4.11 ppm lag das Zentrum des Multipletts für das H-20 Proton. Die Signale der olefinischen Protonen traten bei 7.79, 7.43, 6.19 und 6.13 ppm in Resonanz. Bei ungefähr 2.7 ppm erschien ein breites Hydroxylsignal, das mit D_2O austauschbar war.

Nachdem das Grundgerüst von FAN 2 mit denjenigen von FAN 1/1 und FAN 1/2 identisch war, sollten sich die Verbindungen wiederum nur in der Lage und Zahl der Hydroxylgruppen unterscheiden.

Abb. 41: 500 MHz ^1H -NMR-Spektrum von FAN 2 in CDCl_3

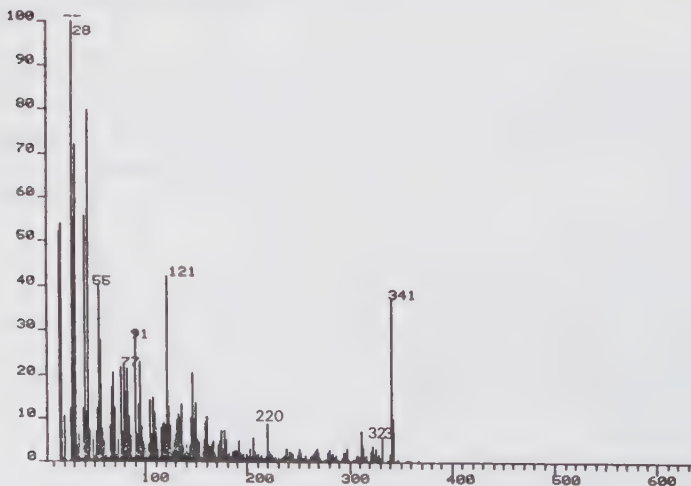


7.2. Bestimmung von Position und Konfiguration der Hydroxylgruppen

Nach der Summenformel $C_{21}H_{27}NO_3$ enthält FAN 2 drei Sauerstofffunktionen im Molekül, d.h. neben der Carbonylgruppe an C-3 sollten noch zwei Hydroxylgruppen vorhanden sein.

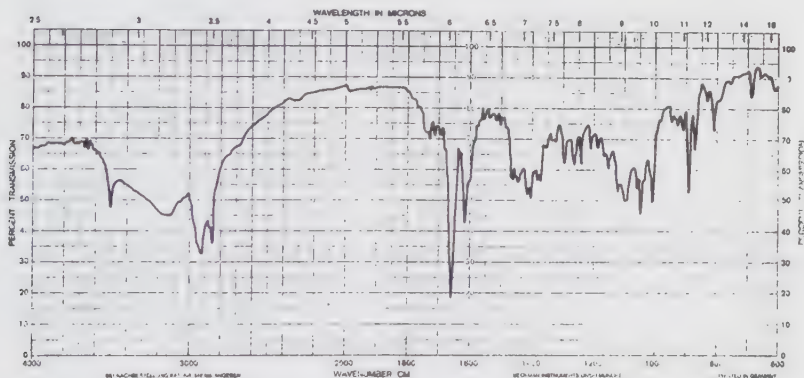
Das Massenspektrum (Abb. 42) zeigte die hierfür typische $M^+ - 18$ Abspaltung bei m/e 323. Die geringe Intensität des Signals ließ starke intramolekulare Wasserstoffbrückenbindung vermuten. Bei m/e 220 trat ein Peak auf, der sowohl bei FAN 1/1 als auch bei FAN 1/2 fehlte. Sein Zustandekommen erklärt sich durch Spaltung des Steroidgerüsts im Ring B (m/e 188 + 16 + 16). Das genaue Fragmentierungsschema ist für Substanz FAN 1/1 erklärt (vgl. 5.2.). Daraus ist zu folgern, daß die Hydroxylgruppen in den Ringen C, D oder E lokalisiert sein müssen. Daneben traten im Massenspektrum das für den A-Ring typische Bruchstück (m/e 121) und das für den Δ^1 -Pyrrolinring charakteristische Signal (m/e 55) auf.

Abb. 42: Massenspektrum von FAN 2



Das IR-Spektrum unterschied sich von denjenigen von FAN 1/1 und FAN 1/2 vor allem durch die scharfe OH-Bande bei 3500 cm^{-1} . Dies ist charakteristisch für das Vorliegen von Wasserstoffbrückenbindungen des nicht chelaten Typs, wie sie z.B. in 1,2-Diolen vorkommen (109). Eine daraufhin durchgeführte Reaktion auf der DC-Platte mit NaJO_4 /Benzidin (110) bestätigte das Vorliegen einer α -Diolgruppierung.

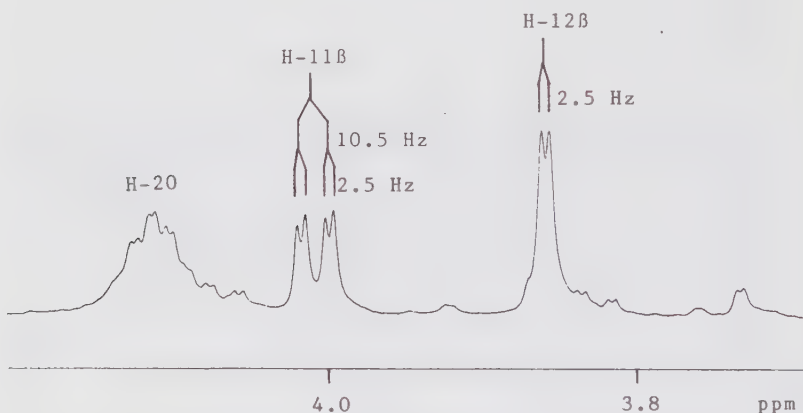
Abb. 43: IR-Spektrum von FAN 2



Die bathochrome Verschiebung des UV-Maximums um ungefähr 2 nm im Vergleich zu unsubstituierten 1,4-Dien-3-Ketonen sprach für die 11 α -Position einer Hydroxylgruppe. Auch die für eine 11 α -OH Substitution typische Veränderung im ^1H -NMR-Spektrum war damit in Übereinstimmung. Die Resonanzlage des olefinischen H-1 Protons war ähnlich wie bei FAN 1/2 zu tieferem Feld verschoben ($\delta = 7.79\text{ ppm}$). Auch das Singulett der tertiären C-19 Methylgruppe stimmte gut mit den von ZÜRCHER (106) postulierten Verschiebungswerten der C-19 Methylgruppe in 11 α -OH substituierten 1,4-Dien-3-Keto-Steroiden überein.

Nachdem somit die Lage der ersten Hydroxylgruppe als 11 α festgelegt war, mußte bei Annahme einer α -Diolstruktur die zweite notwendigerweise am C-12 lokalisiert sein. Die Resonanzlagen der geminal zu den Hydroxylgruppen stehenden Protonen fanden sich im ^1H -NMR-Spektrum bei 3.82 und 4.01 ppm.

Abb. 44: Ausschnitt aus dem 500 MHz ^1H -NMR-Spektrum von FAN 2



Das Signal bei 4.01 ppm spaltete in zwei Dubletts mit Kopplungskonstanten von $J_1 = 10.5$ Hz und $J_2 = 2.5$ Hz auf. Es handelte sich dabei um das β -ständige H-11 Proton, das eine große axial-axiale Kopplung zum H-9 und eine kleine Kopplung zum H-12 zeigte. In Übereinstimmung damit erschien das Dublett des H-12 Protons mit einer Kopplung von $J = 2.5$ Hz bei 3.82 ppm. Die geringe Kopplungsgröße von 2.5 Hz bedingt zwingend eine axiale Stellung der OH-Funktion an C-12. Denn nur diese trans-koplanare Anordnung des Substituenten zum H-11 vermag den Wert für $J_{ax./\ddot{a}q.}$, der normalerweise ca. 5 Hz beträgt, so zu verringern. Bei Vorliegen einer 12 β -OH Funktion wäre eine wesentlich größere axial-axiale Kopplung zu erwarten gewesen.

Lage und Konfiguration der Hydroxylgruppen in FAN 2 waren durch die ^1H -NMR-Spektroskopie eindeutig als $11\alpha\text{-OH}$ und $12\alpha\text{-OH}$ festgelegt worden.

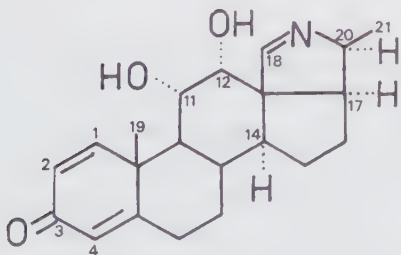
Der Nomenklaturvorschlag für Verbindung FAN 2 lautet somit:
 $11\alpha,12\alpha$ -Dihydroxy-norcona-N(18),1,4-trienin-3-on.

Dieses Steroidalkaloid ist ebenfalls bisher nicht beschrieben worden.

7.3. Darstellung eines Acetonids von FAN 2:

Ein zusätzlicher Beweis für das Vorliegen einer cis-Diol-Anordnung erfolgte, indem von FAN 2 das entsprechende Acetonid dargestellt wurde. Die Umsetzung mit einer Mischung von 2,2-Dimethoxypropan und p-Toluolsulfonsäure in Aceton verlief nicht quantitativ, so daß das Acetonid von der Ausgangsverbindung durch präparative DC im Laufmittel CHCl_3 : MeOH 85:15 abgetrennt werden mußte. Nach Elution mit DCM: Aceton 1:1 und anschließender Membranfiltration stand genügend Substanz zur Verfügung, um die Identität über ein Massenspektrum zu beweisen. Der Molekülpeak wurde entsprechend dem Molekulargewicht bei M^+ 381 registriert.

Abb. 45: Verbindung FAN 2

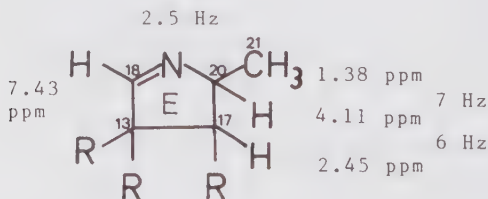


7.4. Bestimmung der Konfiguration an C-20 für Verbindung FAN 2

Anhand von FAN 2 sollte exemplarisch für die anderen Verbindungen untersucht werden, ob in den neu isolierten Funtumia-Alkaloiden die für Conaninderivate übliche 20S-, bzw. 20 α -Konfiguration vorliegt. In den bisher veröffentlichten Arbeiten über Verbindungen mit dem Conanin-Grundgerüst wurde diese Konfiguration stets durch chemische Methoden (Synthese- und Abbaureaktionen (75,76,79,112)), nie jedoch mit Hilfe der ^1H -NMR-Spektroskopie bewiesen.

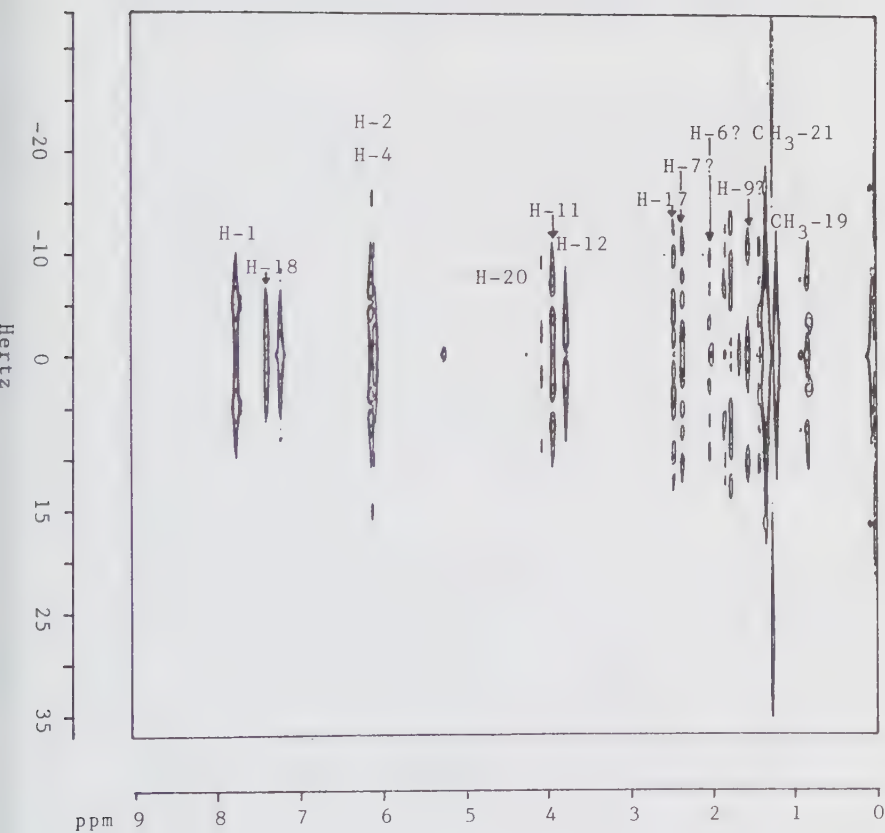
Zunächst legten wir die in diesem Zusammenhang interessierenden Verschiebungslagen der Protonen mit den zugehörigen Kopplungskonstanten fest.

Abb. 46: Resonanzfrequenzen und Kopplungskonstanten im Heteroring E



Um Aussagen über die Konfiguration am C-20 treffen zu können, analysierten wir das Spinsystem des H-20 Protons. Die Kopplungsgröße zur C-21 Methylgruppe ($J = 7$ Hz) und die long-range Kopplung zum Proton an C-18 ($J = 2.5$ Hz) standen fest. Durch ein J-aufgelöstes 2D-Spektrum und ein gedehntes eindimensionales Spektrum (10 Hz/cm) gelang es, die Größe der Kopplungskonstanten zum H-17 Proton zu bestimmen.

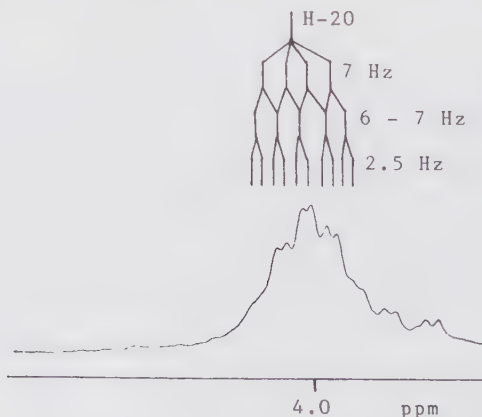
Abb. 47: J-aufgelöstes 2D-Spektrum von FAN 2 in CDCl_3



J-aufgelöste (J-resolved) 2D-Spektren eignen sich zur Bestimmung der Kopplungskonstanten bei komplexen Multipletts. Bei homonuklearen J-aufgelösten 2D-Experimenten erhält man nach einem primären 90° Impuls eine Evolutionszeit t_1 , in deren Mitte ein 180° Impuls liegt. Von Impulspaar zu Impulspaar vergrößert sich t_1 um einen konstanten Betrag. In der Zeit t_1 wird die skalare Kopplung entwickelt, d.h. die Information der Frequenzvariablen F_1 enthält nur die Kopplungen. Die F_2 Information enthält wie üblich das gesamte Spektrum. Durch mathematische Manipulation erhält man ein Konturdiagramm, bei dem die einzelnen Spins als Höhenlinien erscheinen. Kopplungen können so auch bei Systemen mit stark überlappenden Multipletts zugeordnet werden.

Das 2D-Spektrum von FAN 2 zeigte für das Multiplett bei 4.11 ppm nur vier Höhenlinien, wobei eine Kopplungskonstante von 7 Hz auftrat. Die long-range Kopplung war nicht zu sehen. Daraus ist zu folgern, daß die Kopplung zum H-17 überlagert ist und somit eine Größe von 6 - 7 Hz aufweisen muß. Die Signalform des H-20 Protons im gedehnten Spektrum war in guter Übereinstimmung mit der geforderten Kopplung von $J = 6 - 7$ Hz. Nur bei Kopplungsgrößen von 7 Hz (q), 2.5 Hz (d) und 6 - 7 Hz (d) konnte das bei 4.11 ppm registrierte Spinsystem erhalten werden. Damit stand die vicinale Kopplung der Protonen an C-17 und C-20 mit 6 - 7 Hz fest.

Abb. 48: Ausschnitt des 500 MHz ^1H -NMR-Spektrums von FAN 2 (gedehnt)



In Fünfring-Systemen ist es normalerweise schwierig, aus der Kopplungskonstante von vicinalen Ringprotonen die Konfiguration dieser Verbindungen abzuleiten. Tatsächlich kann $^3J_{\text{cis}}$ kleiner oder größer sein als $^3J_{\text{trans}}$. Die durchschnittlichen Werte für $^3J_{\text{cis}}$ liegen im Bereich zwischen 4.5 - 10 Hz, diejenigen für $^3J_{\text{trans}}$ zwischen 0 - 11 Hz. Der Grund hierfür liegt unter anderem darin, daß für Fünfringe zahlreiche Konformationen existieren, die sich energetisch nur wenig unterscheiden (108).

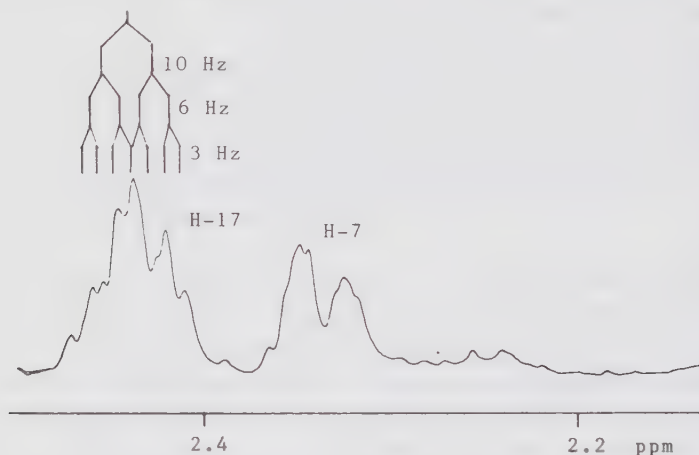
Bei Verbindung FAN 2 hingegen ist der E-Ring, bedingt durch das Hetero-Atom und die Doppelbindung nahezu eben gebaut. Bei cis-Stellung der Protonen an C-17 und C-20 resultiert daraus ein Diederwinkel von nahezu 0° , bei trans-Stellung ein Diederwinkel von ungefähr 120° . Eine auftretende Kopplung von 6 - 7 Hz kann in guter Übereinstimmung mit der KARPLUS-Gleichung (101) einer cis-Kopplung zugeordnet werden.

Bestätigt wurde dieses Ergebnis durch Literaturwerte:

In N-substituierten 2,3-Dimethylindolinen, die einen nahezu planaren Bau aufweisen, treten $^3J_{\text{cis}}$ Werte von 8.61 Hz, dagegen $^3J_{\text{trans}}$ Werte von 2.71 Hz auf (113).

Ähnlich liegen die Kopplungsgrößen in substituierten 2,3-Dihydrofuranen. $^3J_{2,3}$ beträgt bei der cis-Verbindung 7 Hz, bei der trans-Verbindung 3 Hz (108).

Abb. 49: Ausschnitt aus dem 500 MHz ^1H -NMR-Spektrum von FAN 2 (gedehnt)



Die Lage des H-17 Protons konnte aufgrund der aus dem 2D-Spektrum entnommenen Kopplungskonstanten und der Signalform des gedehnten Spektrums mit $\delta = 2.45$ ppm bestimmt werden (vgl. Abb. 49).

$J = 6$ Hz stellt die Kopplung zum H-20 dar. Die Werte von $J = 3$ Hz und $J = 10$ Hz resultieren aus den Kopplungen mit den geminalen Protonen an C-16.

Aus der Literatur (114) ist bekannt, daß die Verschiebungswerte der H-4 Protonen in Δ^1 -Pyrrolinen je nach Substitution zwischen 1.5 - 2.4 ppm betragen. In Fünfringen wird allgemein beobachtet, daß Protonen, die vicinal zu einem Substituenten (z.B. CH_3) stehen, in cis-Stellung stärker abgeschirmt werden als trans-ständige Protonen. Dieser Effekt drückt sich in einer diamagnetischen Verschiebung des Protons in cis-Position aus, wogegen trans-angeordnete

Protonen, bei denen der Abschirmeffekt weniger groß ist, bei tieferem Feld in Resonanz treten. Die Differenz kann bis zu 0.77 ppm betragen (108).

Das H-17 Proton, dessen Resonanzfrequenz bei 2.45 ppm erscheint, ist relativ stark entschirmt. Dies liefert einen zusätzlichen Hinweis auf das Vorliegen von cis-orientierten, α -ständigen Protonen an C-17 und C-20.

Ein abschließend durchgeführtes NOE-Experiment bestätigte dieses Ergebnis. Wie zu erwarten, zeigte sich der Kern-Overhauser-Effekt bei Einstrahlen in H-20 (4.11 ppm) durch einen Intensitätsanstieg des Signals bei 2.45 ppm (H-17). Auch die Kontrolle, bei der das Signal bei 2.45 ppm bestrahlt wurde, fiel positiv aus. Jedoch zeigte sich beim Gegenexperiment, bei dem in der Frequenz der C-21 Methylgruppe eingestrahlt wurde, ebenfalls eine Intensitätszunahme für das H-17 Signal. Dies scheint darauf zurückzuführen zu sein, daß in dem Bereich der Steroidgerüstprotonen die sekundäre Methylgruppe nicht selektiv bestrahlt werden kann und weitere Protonenresonanzen erfaßt werden. Somit kann auch das NOE-Experiment als Beweis für die 20S-Konfiguration gelten.

Aufgrund der Kopplungsgröße zwischen den Protonen H-17 und H-20, der Resonanzlage des H-17 Protons und des NOE-Experimentes konnte die Konfiguration an C-20 eindeutig als 20S, bzw. 20 α bestimmt werden.

7.5. Untersuchung weiterer Resonanzlagen aufgrund des 2D-Spektrums

Mit der Information, die das 2D-Spektrum (vgl. Abb. 47) lieferte, wurde schließlich noch versucht, einige Protonenresonanzen zuzuordnen.

Das Signal bei 2.3 ppm ergab acht Höhenlinien, wobei Kopplungen von 12 und 4 Hz auftraten. Es handelt sich hierbei wahrscheinlich um das äquatoriale Proton an C-7, das neben einer großen geminalen Kopplung ($J = 12$ Hz) drei kleine axial-äquatoriale, bzw. äquatorial-äquatoriale Kopplungen ($J \sim 4$ Hz) aufweist und somit dieses Spinsystem ergibt.

Beim Multipllett mit Zentrum bei 2.1 ppm scheint es sich um das äquatoriale Proton an C-6 zu handeln. Das 2D-Spektrum zeigte sechs "triplett-artig" angeordnete Höhenlinien, d.h. es traten eine geminale Kopplung ($J = 12$ Hz) und je eine axial-äquatoriale, bzw. äquatorial-äquatoriale Kopplung ($J = 3 - 4$ Hz) auf.

Die zugehörigen eindimensionalen Spektren (vgl. Abb. 41) zeigten in beiden Fällen nur schwer analysierbare Multipletts.

Das Signal bei ungefähr 1.6 ppm dürfte von dem H-9 Proton stammen, das zwei axial-axiale Kopplungen von je 10.5 Hz aufweisen sollte. Dadurch erschien es im Spektrum als Triplet.

Eine 100% ige Klärung, ob diese Protonenzuordnung richtig ist, ließe sich jedoch erst durch ein H-H korreliertes 2D-Spektrum erreichen.

8. Bestimmung des Circular dichroismus (CD)

8.1. CD bekannter Verbindungen

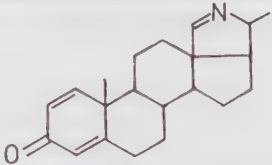
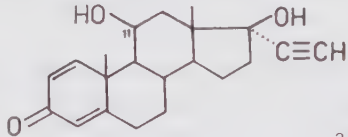
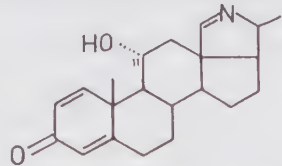
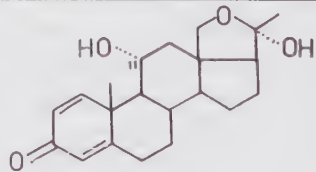
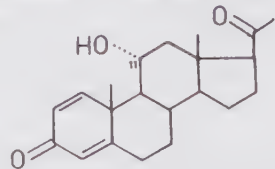
Die durch spektroskopische Methoden ermittelten Konstitutions- und Konfigurationsverhältnisse der Verbindungen FAN 1/1, FAN 1/2 und FAN 2 sollten durch Messungen des Circular dichroismus überprüft werden.

Der Circular dichroismus von gesättigten und ungesättigten Ketosteroiden mit der üblichen trans-Verknüpfung der Ringe B/C ist gut untersucht (115).

So weisen Steroide mit dem 1,4-Dien-3-Keto-Chromophor ein Triplett mit $\Delta\epsilon_{\text{max.}} = -0.293 \pm 0.12$ bei 346 nm auf. Für Steroide mit angegliedertem Heteroring E wurde gezeigt, daß dieser Ring nur einen geringen Einfluß auf die CD-Kurven besitzt (100). Dagegen bewirkt eine 11 α -OH Substitution eine Umkehr des Cotton-Effekts zu positiven Werten. Das Maximum wird dabei zusätzlich ins Längere wellige verschoben. Eine 11 β -OH Substitution beeinflußt den Circular dichroismus dagegen nicht.

In der nachfolgenden Tabelle sind die charakteristischen CD-Maxima einiger ausgewählter Naturstoffe und Synthetika aufgeführt.

Tabelle 8: CD-Werte von 1,4-Dien-3-Ketosteroiden

Substanz	Struktur	$\lambda_{\max.} (\Delta\epsilon)$	Lit.
Maingayin aus Paraval- laris maingayi		333 (-0.17) 345 (-0.18) 359 (-0.15)	(96)
11 β ,17 β -Di- hydroxy-17 α - 1,4-pregnadien- 20-in-3-on		346 (-0.183)	(115)
Holonamin aus Holarrhena antidysenterica		344.5 (+0.57) 356.5 (+0.70) 373 (+0.44)	(91)
Holadyson aus Holarrhena antidysenterica		345 (+0.38) 358 (+0.45) 374 (+0.29)	(100)
11 α -Hydroxy- 1,4-pregnadien- 3,20-dion		345 (+0.71) 358 (+0.87) 374 (+0.64)	(91)

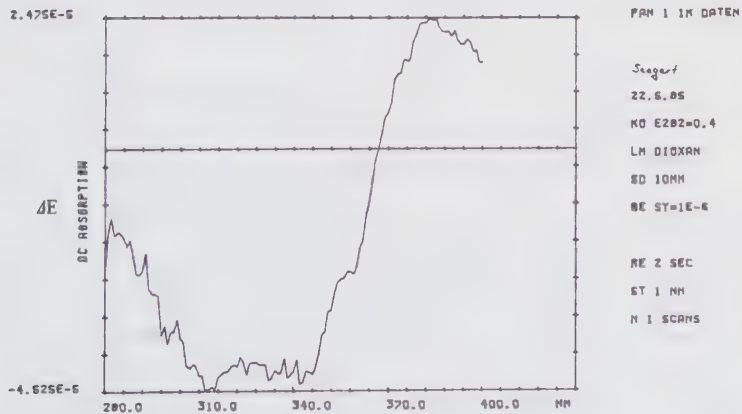
8.2. CD der Funtumia-Alkaloide

Bei der CD-Messung der Verbindungen FAN 1/1, FAN 1/2 und FAN 2 ergaben sich folgende Kurvenbilder.

Abb. 50: CD-Kurven der aus *Funtumia africana* isolierten Verbindungen

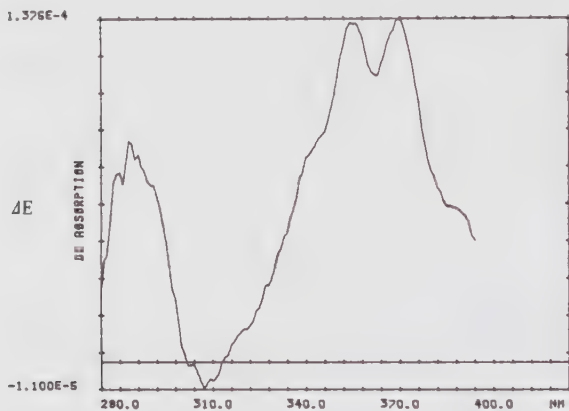
FAN 1/1:

$\lambda_{\max.}(\Delta\epsilon) = 346 \text{ nm } (-0.18)$



FAN 1/2:

$\lambda_{\max.} (\Delta\epsilon) = 346 \text{ nm } (+0.24), 354 \text{ nm } (+0.38),$
 $376 \text{ nm } (+0.39)$

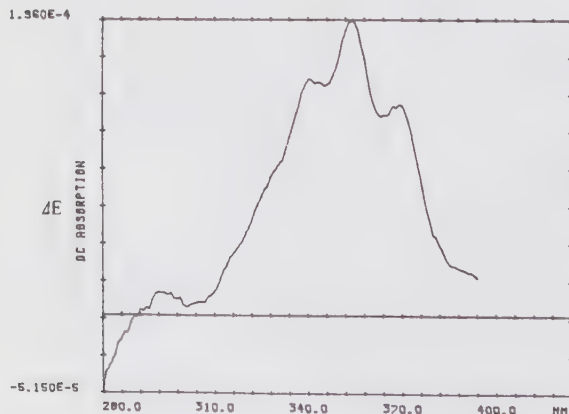


FAN1 Z ZZ.EK DATEN

SEECERT
 ZZ.5.95
 NO E205=0.625
 LM DIOXAN
 SD 10MM
 BE ST=2E-6
 RE Z SEC
 ST 1 NM
 N 1 SCANS

FAN 2:

$\lambda_{\max.} (\Delta\epsilon) = 346 \text{ nm } (+0.52), 360 \text{ nm } (+0.65),$
 $375 \text{ nm } (+0.46)$



FAN 2 ZZ.EK DATEN

SEECERT
 ZZ.5.95
 NO E200=0.55
 LM DIOXAN
 SD 10MM
 BE ST=2E-6
 RE Z SEC
 ST 1 NM
 N 1 SCANS

Für Verbindung FAN 1/1 erhielten wir einen negativen CD mit Maximum $\Delta\epsilon_{\text{max.}} = -0.18$ bei 346 nm. Dies stimmt gut mit den Werten für 1,4-Dien-3-Ketone überein. Die 12 α -OH-Gruppe hat somit keinen Einfluß auf die Rotationsdispersion.

Bei den Verbindungen FAN 1/2 und FAN 2 ergaben sich entsprechend der 11 α -OH Substitution jeweils Spektren mit positivem Cotton-Effekt. Die geringen Abweichungen der Werte von FAN 1/2 und Holonamin-Literaturwerten sind wohl auf das große Signal-Rausch-Verhältnis bei den alten Aufnahmen zurückzuführen.

Die CD-Messungen zeigten, daß in allen drei Verbindungen die übliche Stereoidkonfiguration vorlag. Lage und Konfiguration der Hydroxylgruppen konnten nochmals bestätigt werden.

9. HPLC-Untersuchungen

9.1. Vergleichende HPLC von Funtumia- und Holarrhena-Rohalkaloidextrakten

Durch vergleichende HPLC-Untersuchungen von Funtumia africana und Holarrhena antidysenterica gelang es erneut, die unterschiedliche Alkaloidführung beider Drogen zu demonstrieren.

Als Proben verwendeten wir 0.5% ige Lösungen der Rohalkaloidfraktionen in Methanol. Eine direkte Bestimmung der Alkaloide aus dem Methanolextrakt war - wie schon die dünn-schichtchromatographischen Untersuchungen vermuten ließen - nicht möglich. Erst nach Anreicherung durch Säure-Basenausschüttelung ließen sich die Alkaloide in DC und HPLC nachweisen.

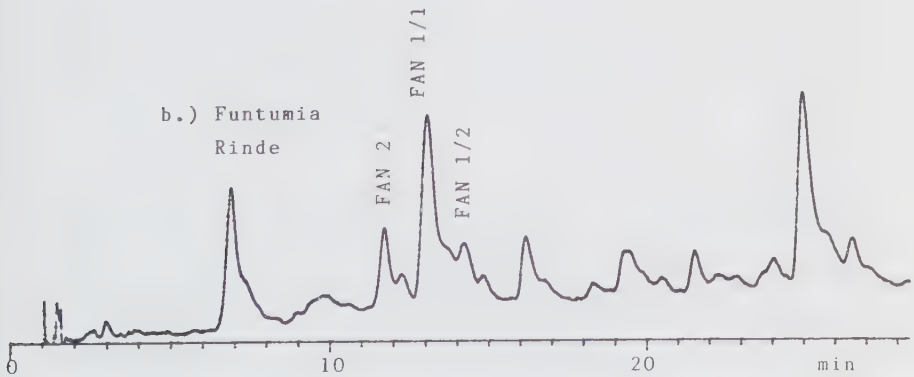
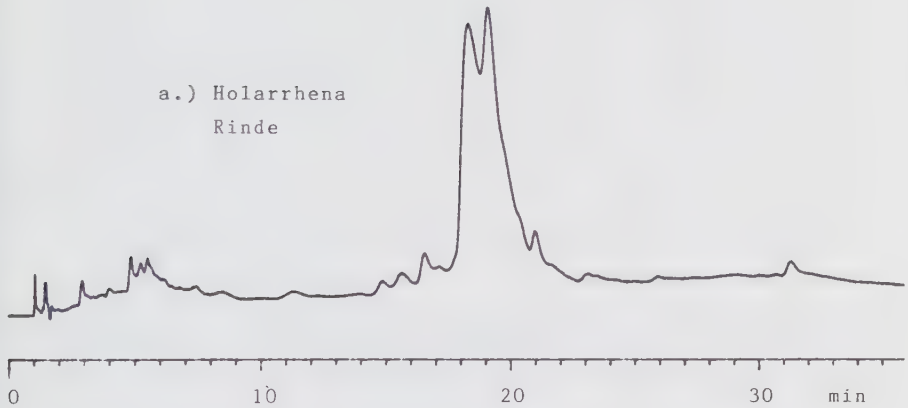
Da auch Alkaloide ohne ausgeprägten Chromophor erfaßt werden sollten, konnten die bisher verwendeten Trennsysteme, die einen $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ - oder PIC B7-Zusatz enthielten und daher nur eine Detektion bis 240 nm gestatteten, nicht verwendet werden. Wir arbeiteten mit Zusatz von Low UV PIC B7 Reagenz (Fa. Waters), das eine Detektion bis 200 nm erlaubte. Für den Funtumia-Extrakt erhielten wir bei Verwendung eines Acetonitril-Wasser Gradientensystems als mobiler Phase eine zufriedenstellende Trennung der Alkaloide. Obwohl sich das System zur Untersuchung der Holarrhena-Alkaloide als weniger günstig erwies, wählten wir trotzdem die gleichen Analysenbedingungen wie für die Funtumia-Alkaloide, um so einen direkten Vergleich beider Drogen zu haben.

Die Identifizierung der Peaks erfolgte durch Vergleich der Retentionszeiten mit denen der isolierten Verbindungen und durch simultan aufgenommene UV-Spektren. On-line aufgezeichnete UV-Spektren zeigten, daß in Funtumia keine weiteren Verbindungen mit dem 1,4-Dien-3-Keto-Grundgerüst vorhanden waren.

Im Vergleich dazu zeigte der Holarrhena-Extrakt - wie aufgrund der DC zu vermuten war - keine Übereinstimmung der Peaks mit denen von Funtumia.

Holonamin (= FAN 1/2) war ebenfalls nicht nachweisbar. Dies ist verständlich, da TSCHESCHE (91) diese Verbindung nur in 0.0009% iger Ausbeute aus Holarrhena antidysenterica isolieren konnte. Die Hauptverbindungen des Extraktes mit Retentionszeiten von 18.21, bzw. 18.99 Minuten zeigten im UV nur Endabsorption. Dies war zu erwarten, da die Holarrhena-Hauptalkaloide, z.B. das Conessin, keinen Chromophor besitzen.

Abb. 51: HPLC-Chromatogramme der Rohalkaloidfraktionen
von Holarrhena und Funtumia



Geräte- und Trennparameter, siehe Exp. Teil III.3.4.

9.2. Quantitative Bestimmung der Hauptalkaloide in Funtumia africana

Zur quantitativen Bestimmung der Hauptalkaloide wurde eine 0.5% ige Rohalkaloidfraktion von Funtumia africana verwendet. Die Bestimmung erfolgte über die HPLC nach der Methode des externen Standards, wobei eine 0.1% ige Lösung von FAN 1/2 als Eichsubstanz diente. Durch Messungen unterschiedlicher Probenmengen wurde eine Eichgerade erstellt, mit deren Hilfe die Konzentration der Alkaloide direkt abgelesen werden konnte. Detektiert wurde im ungefähren Absorptionsmaximum der Substanzen bei 240 nm.

Die Verwendung von FAN 1/2 als Eichsubstanz für alle drei Verbindungen ist möglich, da sie ähnliche Molekulargewichte (FAN 1/1 und FAN 1/2: MG 325; FAN 2: MG 341) haben und aufgrund struktureller Ähnlichkeiten annähernd gleiche UV-Maxima und ϵ -Werte besitzen.

Die nachfolgend aufgelisteten %-Gehalte (bezogen auf die Rohalkaloidfraktion) wurden ermittelt.

Tabelle 9: Gehalt der Rohalkaloidfraktion in %

FAN 1/1	14.17%
FAN 1/2	1.67%
FAN 2	6.07%

10. Pharmakologische Untersuchungen*

Für *Funtumia africana* existierten bisher keine pharmakologischen Untersuchungen. Da jedoch *Holarrhena antidysenterica*, eine mit *Funtumia* eng verwandte Droge, in der Volksmedizin bei Herz- und Kreislauferkrankungen eingesetzt wird (75) und sich in den entsprechenden pharmakologischen Tests als aktiv erwiesen hatte (84), wurde der Methanolextrakt von *Funtumia africana* ebenfalls auf Herz-Kreislaufwirkungen untersucht.

Die *in vivo* Tests wurden an narkotisierten Ratten, die *in vitro* Untersuchungen an isolierten Meerschweinchenvorhöfen durchgeführt. In beiden Modellen wurde nach i.v. Injektion, bzw. Eingabe in das Organbad eine Verminderung der Herzfrequenz bei der Ratte, bzw. der spontanen Schlagfrequenz beim Meerschweinchenvorhof ausgelöst. Die Bradykardie im *in vivo* Versuch war dabei schwächer (max. 18% bei 20 mg/kg i.v.) und nur von kurzer Dauer (15 Minuten). Eine Beeinflussung des Blutdrucks erfolgte nicht.

Im *in vitro* Modell wurde zusätzlich eine schwach positiv inotrope Wirkung registriert. Maximale Effekte hinsichtlich Bradykardie (30%) und positiver Inotropie (25 - 30%) wurden bei einer Konzentration von 100 µg/ml Badflüssigkeit beobachtet. Die Effekte waren auch nach einer Einwirkzeit von 30 Minuten deutlich.

Das Wirkprofil von *Funtumia africana* ist damit ähnlich demjenigen von *Holarrhena antidysenterica*. Extrakte von *Holarrhena antidysenterica* bewirken im *in vivo* und *in vitro* Versuch ebenfalls eine Bradykardie. Die Dosis-Wirkungskurve verläuft allerdings bei *Holarrhena antidysenterica* steiler als bei *Funtumia africana* (84,120).

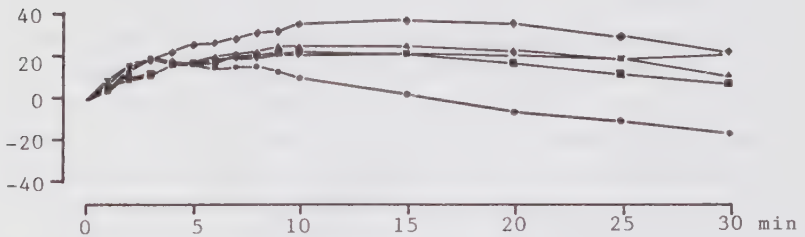
* Die Untersuchungen wurden von der Fa. Madaus, Köln, durchgeführt.

Abb. 52: Testung des Funtumia-Methanolextraktes an isolierten Meerschweinchenvorhöfen

Prüfsubstanz: Funtumia africana, Methanolextrakt
Konzentrationen: 10 µg/ml Badflüssigkeit  
20 µg/ml Badflüssigkeit  
30 µg/ml Badflüssigkeit  
100 µg/ml Badflüssigkeit  
Kontrollsubstanz: PÄG 400  

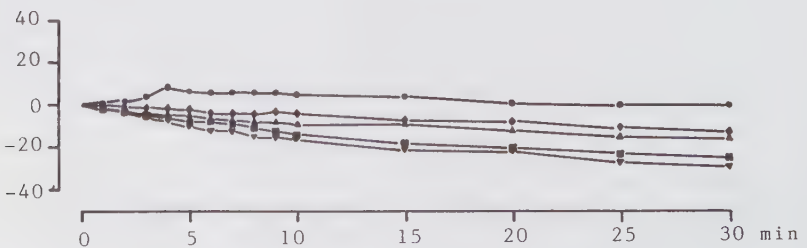
a.) Beeinflussung der Kontraktionskraft am isolierten linken Vorhofpräparat

Änderung des
Hubs in %



b.) Beeinflussung der Herzfrequenz am isolierten rechten Vorhofpräparat

Änderung der
Frequenz in %



11. Zusammenfassung der in Teil II (*Funtumia africana*
(Benth.) Stapf) erhaltenen Ergebnisse

Aus der Rinde von *Funtumia africana* konnten drei Alkaloide isoliert werden, die sich alle vom Conanin-Grundgerüst ableiten. Die Alkaloide FAN 1/1 und FAN 2 stellen bisher nicht beschriebene Verbindungen dar. FAN 1/2 ist mit dem aus *Holarrhena antidysenterica* isolierten Holonamin identisch.

Während in anderen *Funtumia*-Arten, z.B. in *Funtumia elastica* (98) und *Funtumia latifolia* (116,117), bereits Alkaloide vom Conanintyp gefunden wurden, konnte diese Grundstruktur nun zum ersten Mal auch in *Funtumia africana* nachgewiesen werden.

Z U S A M M E N F A S S U N G

In der vorliegenden Arbeit wurden die südamerikanische Pflanze Spigelia anthelmia L. und die in Zentral- und Westafrika beheimatete Funtumia africana (Benth.) Stapf phytochemisch untersucht und pharmakologisch auf Herz- und Kreislaufwirkungen geprüft.

1. Die in früheren Untersuchungen (6) postulierte Alkaloidführung von Spigelia anthelmia konnte bestätigt werden. Der Alkaloidgehalt der Droge war jedoch sehr gering. Er ließ sich in einen lipophilen, wasserdampflichten Anteil und in eine quartäre Alkaloidfraktion untergliedern.

Durch Wasserdampfdestillation konnte eine Anreicherung der flüchtigen Alkaloide erreicht werden. Daraus wurde durch präparative HPLC Verbindung SA 1 isoliert und als Isochinolin identifiziert. Das im Destillat weiterhin vorhandene Alkaloid SA 2 konnte wegen der sehr geringen Konzentration nicht völlig rein dargestellt werden. Aufgrund von GC/MS-Analysen und dünnschichtchromatographischen Untersuchungen gelang jedoch eine Charakterisierung des Alkaloids als tertiäre Pyridinverbindung vom Molekulargewicht 147. Das Vorliegen einer Monoterpenalkaloidstruktur vom Actinidintyp, möglicherweise ein Actinidin-Isomeres, ist wahrscheinlich.

Durch Dünnschichtchromatographie ließ sich Secologanin, das neben Loganin die biosynthetische Vorstufe der Monoterpenalkaloide darstellt, nachweisen.

Hauptbestandteil der quartären Alkaloidfraktion ist Cholin, das isoliert und durch spektroskopische Methoden identifiziert wurde. Zwei weitere Verbindungen waren für eine Isolierung in zu geringer Konzentration vorhanden. Sie konnten jedoch durch Abbaureaktionen (Hydrolysen) und einen dünnsschichtchromatographischen Vergleich als 3,3-Dimethyl-acryloylcholin und Benzoylcholin identifiziert werden.

In der Ethylacetat- und Butanolausschüttelung der Droge konnten Chlorogensäure, Protocatechusäure, Kaffeesäure, 2,3-Dihydroxybenzoesäure, Vanillinsäure und Hyperosid nachgewiesen werden.

Die Untersuchung der Samen von Spigelia anthelmia L. und der oberirdischen Teile von Spigelia humboldtiana Champ. & Schlecht. ergab keine Hinweise auf flüchtige Alkaloide. Cholin war jedoch in beiden Drogen enthalten.

2. Aus der bisher phytochemisch nicht untersuchten Rinde von Funtumia africana wurden durch Kombination verschiedener Methoden (Säulenchromatographie, präparative DC und HPLC) drei Hauptalkaloide isoliert und mit Hilfe spektroskopischer Methoden in ihrer Struktur aufgeklärt.

Die Verbindung FAN 1/1 wurde als das bisher nicht beschriebene 12 α -Hydroxy-norconina-N(18),1,4-trienin-3-on identifiziert.

Alkaloid FAN 1/2 stellt das 11 α -Hdroxy-norconina-N(18),1,4-trienin-3-on dar. Es ist damit identisch mit Holonamin, das erstmals von TSCHESCHE (91) aus *Holarrhena antidysenterica* isoliert wurde. Dies belegt die große Verwandtschaft beider Drogen.

Bei Substanz FAN 2 handelt es sich um das 11 α ,12 α -Dihydroxynorconan-N(18),1,4-trienin-3-on, das bisher ebenfalls noch nicht bekannt war.

Für Verbindung FAN 2 konnte erstmals die für Conaninderivate übliche 20S-, bzw. 20 α -Konfiguration mit Hilfe der ¹H-NMR-Spektroskopie (eindimensionales Spektrum, J-aufgelöstes 2D-Spektrum, NOE-Experimente) festgelegt werden.

Durch CD-Messungen wurden die spektroskopisch ermittelten Konfigurationsverhältnisse der Alkaloide FAN 1/1, FAN 1/2 und FAN 2 bestätigt.

3. Extrakte von *Spigelia anthelmia* und *Funtumia africana* wurden sowohl in vitro als auch in vivo auf ihre Herz-Kreislaufwirkungen geprüft.

Im in vivo Versuch bewirkten Extrakte von *Spigelia anthelmia* je nach Tiermodell eine Blutdrucksenkung (Ratte), bzw. eine Blutdrucksteigerung (Meerschweinchen). Ein Effekt der Cholinester wird diskutiert. Im in vitro Modell mit isolierten Meerschweinchenvorhöfen wurde bei Applikation des Extraktes eine negativ chronotrope und negativ inotrope Wirkung, bei Zugabe von Isochinolin (= SA 1) eine starke, dosisabhängige positive Inotropie beobachtet. Eine Überlagerung mehrerer Wirkprinzipien in *Spigelia* ist daher wahrscheinlich.

Extrakte von *Funtumia africana* zeigten sowohl im in vivo Versuch an der Ratte als auch im in vitro Modell an isolierten Meerschweinchenvorhöfen eine Verminderung der Herzfrequenz, bzw. der spontanen Schlagfrequenz. Die Droge weist damit ähnliche pharmakologische Eigenschaften wie die bereits gut untersuchte *Holarrhena antidysenterica* (84) auf.

EXPERIMENTELLER TEIL

I. Herkunft des Drogenmaterials

Spigelia

Oberirdische Teile von Spigelia anthelmia

- Prof. M.P. Gupta, Laboratorio Especializados de Analisis, Universidad de Panama (450 g)
- Fa. Celo, Zweibrücken
- Fa. Galke, Gittelde, Harz
- Fa. Heel, Baden-Baden

Samen von Spigelia anthelmia

Prof. M.P. Gupta, Laboratorio Especializados de Analisis, Universidad de Panama (50 g)

Oberirdische Teile von Spigelia humboldtiana

Prof. M.P. Gupta, Laboratorio Especializados de Analisis, Universidad de Panama (50 g)

Valeriana officinalis

Fa. Klenk, Schweinfurt

Funtumia africana

Rinde (900 g) und Blätter (300 g) von Dr. M. Ilyas, Dept. of Pharmaceutical and Medicinal Chemistry, Ahmadu Bello University, Zaria, Nigeria

Holarrhena antidysenterica

Rindenmaterial (100 g) von Dr. M. Ilyas, Dept. of Pharmaceutical and Medicinal Chemistry, Ahmadu Bello University, Zaria, Nigeria

II. Herkunft der Vergleichssubstanzen

Spigelia

Isochinolin, Fa. Merck, Art.Nr. 802406
Cholinchlorid, Fa. Merck, Art.Nr. 500117
Benzoylcholinchlorid, Fa. Sigma, Art.Nr. B 5000
Flavonoid- und Säurevergleichssubstanzen, Secologanin,
Institut f. Pharmazeutische Biologie der Universität
München

Funtumia

Conessin, Prof. S. Siddiqui, Dept. of Chemistry, University of Karachi

III. Allgemeine Arbeitsmethoden

1. Fällungsreagenzien für Alkaloide

VALSERS Reagenz (30):

15 g Quecksilber-(II)-iodid werden in 100 ml einer 10% igen wässrigen Kaliumiodid-Lösung eingetragen und solange gerührt, bis fast alles gelöst ist. Nach Filtrieren ist das Reagenz gebrauchsfertig.

MAYERS Reagenz (31):

1.36 g Quecksilber-(II)-chlorid werden in 60 ml Wasser gelöst und mit 10 ml einer 50% igen wässrigen Kaliumiodid-Lösung verrührt. Die Mischung wird mit Wasser auf 100 ml verdünnt.

Test: Beim Alkaloid-Screening (Extraktbereitung, siehe Allg. Teil I.2.3. und II.2.1.) werden zu einer salzsauren Lösung einige Tropfen Reagenz gegeben. Der Test wird auf

einem Uhrglas gegen einen dunklen Hintergrund durchgeführt. Bei Anwesenheit von Alkaloiden entsteht je nach Konzentration eine schwache Opaleszenz oder ein deutlicher Niederschlag. Als Vergleich dient eine 0.01% ige Strychninlösung, die analog der Prüflösung behandelt wird.

REINECKE-SALZ-Lösung auf quartäre Alkaloide (29):

Bei Anwesenheit von quartären Alkaloiden entsteht auf Zugabe einer gesättigten Reinecke-Salz-Lösung zur salzsauren Analysenlösung (Herstellung, siehe Allg. Teil I.2.3.) ein rötlicher Niederschlag.

2. Dünnschichtchromatographie

2.1. Adsorbentien

für die analytische DC

Kieselgel 60 F₂₅₄-Fertigplatten 20 x 20 cm, Schichtdicke 0.25 mm, Fa. Merck, Art.Nr. 5715
Kieselgel 60 F₂₅₄-Fertigplatten für die Nano-DC (HPTLC), 10 x 20 cm, Fa. Merck, Art.Nr. 5642
Cellulose F Fertigplatten 20 x 20 cm, Schichtdicke 0.1 mm, Fa. Merck, Art.Nr. 5718

für die präparative DC

Kieselgel 60 F₂₅₄-Fertigplatten 20 x 20, Schichtdicke 0.5 mm, Fa. Merck, Art.Nr. 5744
Die Platten wurden 2 mal mit Methanol vorentwickelt.

Auftragetechnik

analytisch: bandförmig mit ausgezogenem Kapillarröhrchen
präparativ: bandförmig mit schablonegeführter Mikroliterpipette, deren Öffnung mit wenig Watte verschlossen wurde

2.2. Laufmittelsysteme

Spigelia anthelmia

Alkaloide

CHCl₃:MeOH 95:5

quartäre Alkaloide

EtOAc:AcOH:H₂O 70:25:25

n-BuOH:H₂O:AcOH 40:50:10 (Oberphase), Cellulose

Flavonoide

Glykoside: EtOAc:AcOH:HCOOH:H₂O 100:11:11:26

Aglyka: Toluol:Ethylformiat:HCOOH 50:40:10

Zucker

CHCl₃:MeOH:H₂O:AcOH 8:6:1:1

Säuren

DCM:H₂O:AcOH 100:50:50 (Unterphase)

DCM:Toluol:HCOOH 50:40:10 (2x entwickeln)

Toluol:Ether 50:50 gesättigt mit 10% iger AcOH

n-BuOH/NH₃ gesättigt, Cellulose

Secologanin

LM I: CHCl₃:MeOH 4:1

LM II: Aceton:CHCl₃:H₂O 80:20:5

Herzglykoside

EtOAc:MeOH:H₂O 100:13.5:10

Funtumia africana

Alkaloide

CHCl₃:MeOH 85:15

Ether/NH₃ gesättigt, in NH₃-Atmosphäre

Acetonid

CHCl₃:MeOH 85:15

Diacetat

CHCl₃:MeOH 20:1

2.3. Detektion

Nach dem Trocknen wurden die Platten zuerst im UV 254 und UV 366 ausgewertet und anschließend mit einem der folgenden Reagenzien besprüht.

Alkaloide

Dragendorff Reagenz nach MUNIER und MACHEBOEUFF (33)

0.85 g basisches Wismutnitrat werden in 10 ml Eisessig und 40 ml Wasser gelöst und zu gleichen Teilen mit einer Lösung von 8 g Kaliumiodid in 20 ml Wasser gemischt. 10 ml dieser Vorratslösung, 20 ml Eisessig und 100 ml Wasser dienen als Sprühlösung.

Durch Nachbesprühen mit 10% iger wässriger NaNO_2 -Lösung läßt sich die Nachweisempfindlichkeit erhöhen.

Unterscheidung primärer, sekundärer und tertiärer Stickstoffverbindungen nach RANIERI (47)

Nach Alkalisieren in einer NH_3 -Kammer werden die Platten mit einer 0.02% igen Lösung von Fluorescamin (Fa. Serva) in Aceton p.a. besprüht. Primäre Amine fluoreszieren hellblau, sekundäre Amine dunkelblau im UV 366. Tertiäre Amine werden erst beim Nachbesprühen mit Jodplateat im vis sichtbar.

Tertiäre Pyridinverbindungen (KÖNIGS Reagenz (48))

1:1 Mischung aus 2% iger p-Aminobenzoesäurelösung in Ethanol und 0.1M Phosphatpuffer (pH 7). Nach 15 minütigem Trocknen werden die Platten in eine Bromcyan-Kammer gestellt.

Aldehyde, Ketone (89)

0.4% ige Lösung von 2,4-Dinitrophenylhydrazin in 2N HCl. Nachbehandlung mit einer 0.2% igen Kaliumhexacyanoferrat-(III)-Lösung in 2N HCl.

Secologanin

4-Amino-3-hydrazino-5-mercapto-1,2,4-triazol in 0.5N NaOH, gesättigt, 10 min, 115°C, Tockenschrank

α -Diolgruppierungen (110)

Detektion mit Lösung 1 (0.1% ige wässrige NaJO_4 -Lösung), nach 5 Minuten Nachbesprühen mit Lösung 2 (1.8 g Benzidin, 50 ml EtOH, 50 ml H_2O , 20 ml Aceton, 10 ml 0.2N HCl)

Steroide

Nach Detektion und 5 - 10 minütigem Erhitzen im Trockenschrank bei 100°C entstehen Färbungen und Fluoreszenzen mit folgenden Reagenzien:

- Cer-(IV)-sulfat in 65% iger H_2SO_4 , gesättigt (86)
- Antimon-(III)-chlorid in CHCl_3 (20, bzw. 25 g/100 ml) (CARR-PRICE Reagenz (28,87))
- Acetanhydrid/ H_2SO_4 (LIEBERMANN-BURCHARDS Reagenz (28))
5 ml Acetanhydrid und 5 ml H_2SO_4 konz. werden unter Eiskühlung gemischt und danach unter Kühlung in 50 ml absoluten Ethanol eingetragen.
- GODIN Reagenz (88)
Vorbesprühen mit 10% iger ethanolischer H_2SO_4
Nachbehandlung mit 1% iger ethanolischer Vanillinlösung

Flavonoide und Säuren

- Naturstoffreagenz (1% ig in Ethanol), Nachbesprühen mit PÄG 400 (5% ig in Ethanol)
- FeCl_3 (5% ig in Ethanol)

Zucker

Mischung aus Anilin, Diphenylamin, 85% iger Phosphorsäure und Methanol (2 ml, 2 g, 10 ml, ad 100 ml), Farbreaktion nach 10 Minuten im Trockenschrank bei 120°C

Herzglykoside

- KEDDE Reagenz (27), 1:1 Mischung von 3,5-Dinitrobenzoesäure (3% ig in Ethanol) und 2N KOH
- Antimon-(III)-chlorid/ CHCl_3 (20 g/100 ml)

3. HPLC

3.1. Apparative Daten

(a) Liquid Chromatograph HP 1090 und HP 1040 A Photo-
diodenarray-Detektor, kombiniert mit HP 85 B Tisch-
computer, HP 9121 Diskettenlaufwerk und HP 7470 A
Plotter (Hewlett Packard, Waldbronn)

(b) Pumpe: M 6000 A (Fa. Waters)
Gradientenprogrammer: M 660 (Fa. Waters)
Einspritzteil: WISP 710 B (Fa. Waters)
Datensystem: M 730 (Fa. Waters)
Detektor: LC 75 (Perkin-Elmer)

(c) Pumpe: Perkin-Elmer Serie 3 B
Injektionssystem: U 6 K (Fa. Waters)
Detektor: Schoeffel SF 770 Spektralphotometer

3.2. Lösungsmittel

Als Fließmittel für die HPLC wurden ausschließlich Lö-
sungsmittel in ChromAR Qualität der Fa. Promochem, Wesel,
verwendet. Das Wasser war destilliert.

3.3. Einspritzmenge:

Reinsubstanzen: 5 - 10 μ l einer 0.02 - 0.1% igen Lösung
Extrakte: 5 - 10 μ l einer 0.5% igen Lösung
(analytisch)
50 - 100 μ l einer 0.5 - 2% igen Lösung
(präparativ)

3.4. Trennsysteme für die analytische HPLC (TS)

TS 1: Versuch zur Trennung des Spigelia Destillats (DSA)

Apparative Daten: Gerät (c)

Säule: μ -Bondapak C 18 (10 μ m) (300 x 4 mm ID) (Fa. Waters)

Laufmittel: Acetonitril-Wasser-PIC B7 20:80:2

Durchfluß: 2 ml/min

Detektion: UV 240 nm (0.04, bzw. 0.1)

TS 2: Versuch zur Trennung des Spigelia Destillats (DSA)

Apparative Daten: Gerät (c)

Säule: μ -Bondapak C 18 (10 μ m) (300 x 4 mm ID) (Fa. Waters)

Laufmittel: Acetonitril - 10 mMol $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ -Lösung 20:80

Durchfluß: 2 ml/min

Detektion: UV 240 nm (0.04, bzw. 0.1)

TS 3: HPLC-Analyse der Flavone von Spigelia

Apparative Daten: Gerät (a)

Säule: Lichrospher RP 18 (5 μ m) (125 x 4 mm ID) (Fa. Merck)

Laufmittel: A: Acetonitril-Wasser-Essigsäure 12:88:1

B: Acetonitril-Wasser-Essigsäure 30:70:1

Gradient: von 0% B nach 100% B in 30 min, linear

Durchfluß: 1 ml/min

Detektion: UV 340 nm (Attn (mAU): 40.0)

TS 4: Identifizierung und Quantifizierung der in den

Cholinestern gebundenen organischen Säuren

Apparative Daten: Gerät (b)

Säule: Lichrospher RP 18 (5 μ m) (125 x 4 mm ID) (Fa. Merck)

Laufmittel: A: Acetonitril-Wasser-Essigsäure 15:85:2

B: Acetonitril-Wasser-Essigsäure 30:70:2

Gradient: von 0% B nach 100% B in 30 min, linear

Durchfluß: 1 ml/min

Detektion: UV 254 nm (0.08)

TS 5: Vergleich zwischen Funtumia- und Holarrhena-Alkaloidextrakten

Apparative Daten: Gerät (a)

Säule: μ -Bondapak C 18 (10 μ m) (300 x 4 mm ID) (Fa. Waters)

Laufmittel: A: Acetonitril-Wasser-Low UV PIC B7 15:85:2

B: Acetonitril-Wasser-Low UV PIC B7 35:65:2

Gradient: von 0% B nach 100% B in 30 min, linear

Durchfluß: 2 ml/min

Detektion: UV 200 nm (Attn (mAU): 200.0, bzw. 150.0)

TS 6: Quantitative Bestimmung der Funtumia-Alkaloide und
Reinheitsprüfung nach präparativer DC

Apparative Daten: Gerät (b)

Säule: μ -Bondapak C 18 (10 μ m) (300 x 4 mm ID) (Fa. Waters)

Laufmittel: Acetonitril-Wasser-PIC B7 20:80:2

Durchfluß: 2 ml/min

Detektion: UV 240 nm (0.08)

3.5. Trennsysteme für die präparative HPLC (PTS)

PTS 1: Isolierung der Spigelia-Alkaloide SA 1 und SA 2

Apparative Daten: Gerät (c)

Säule: Lichrosorb Si 60 (7 μ m) (250 x 7 mm ID) (Fa. Merck)

Laufmittel: n-Hexan-Ethylacetat 8:1

Durchfluß: 2 ml/min

Detektion: UV 254 nm

PTS 2: Isolierung der Funtumia-Alkaloide FAN 1/1 und
FAN 1/2

Apparative Daten: Gerät (c)

Säule: μ -Bondapak C 18 (300 x 7.8 mm ID) (Fa. Waters)

Laufmittel: Acetonitril-10 mMol $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ -Lösung 29:71

Durchfluß: 3 ml/min

Detektion: UV 240 nm

4. Gaschromatographie

4.1. Apparative Daten

Geräte: (a) Perkin-Elmer 900

(b) Perkin-Elmer Sigma 1 B

Trägergas: Argon

Detektor: FID

Temperatur: Detektor und Einspritzblock: 250°C

4.2. Trennsysteme (GC-TS)

GC-TS 1: Flüchtige Alkaloide in *Spigelia*

Gerät (b)

Säule: OV 225, 25 m, 0.23 mm ID, Chrompack 14024-Kapillarsäule

Temperatur: Programm von 90°C (5 min) - 170°C (15 min),
Aufheizrate: 4°C/min

GC-TS 2: Flüchtige Säuren nach Hydrolyse der Cholinester

Gerät (a)

Säule: 25% Diethylhexylsebacinat/Sebacinsäure auf
Chromosorb W-NAW (80 - 100 mesh)

Temperatur: 145°C isotherm

GC-TS 3: BSTFA*^{*}-Verbindungen der Säuren nach Hydrolyse
der Cholinester

Gerät (a)

Säule: 16% OV 210-Gas Chrom Q auf Chromosorb (100 -
200 mesh)

Temperatur: Programm von 100°C - 250°C,
Aufheizrate: 6°C/min

* bis(Trimethylsilyl)-trifluoro-acetamid

5. Physikalisch-chemische Untersuchungen

Schmelzpunkte:

Gerät: Kofler-Heizbank der Fa. Reichert, Wien
Die Substanzen wurden über Phosphorpentoxid getrocknet.
Die angegebenen Schmelzpunkte sind unkorrigiert.

Optische Drehung:

Gerät: Lichtelektrisches Polarimeter LEP A 2 (Fa. Zeiss)
Lösungsmittel: Chloroform UVASOL[®] (Fa. Merck)

UV-Spektren:

Gerät: UV-Spektrophotometer DB-GT (Fa. Beckman)
Lösungsmittel: Methanol p.a.
Schichtdicke: 1 cm

IR-Spektren:

Gerät: AccuLab-1 (Fa. Beckman)
KBr-Preßling: 1mg Substanz/100 mg KBr

CHN-Analysen:

Gerät: CHN-Analysator 185 (Fa. Hewlett Packard)
Einwaage: 0.6 - 1 mg

CD-Spektren:

Gerät: Jobin-Yvon Auto-Dichrograph Mark V
Lösungsmittel: Dioxan, ChromAR Qualität (Fa. Promochem)
Schichtdicke: 1 cm
Konzentration: 0.25 - 0.35 mMol/l

¹H-NMR-Spektren:

Geräte: Bruker WP-80
Bruker WP-200
Bruker AM-500

Lösungsmittel: CDCl_3 , bzw. DMSO-d_6 mit TMS als internem
Standard

Massenspektren:

Gerät: Massenspektrometer Kratos MS 80 RFA

Gaschromatographie-Massenspektrometrie:

Gaschromatograph:

(a) Carlo Erba (Mailand) Kratos MFC 500

Trärgas: Argon

Einspritzblock: 250°C

Säule: OV 225 Kapillarsäule, 0.23 mm ID, Chrom-
pack 14024

Temperaturprogramm: von 90°C (5' min) - 150°C,
Aufheizrate: 4°C/min

(b) Hewlett Packard 5840 A

Trärgas: Helium

Einspritzblock: 250°C

Säule: OV 101 Kapillarsäule, 9 m x 0.35 mm

Temperaturprogramm: von 100°C (2 min) - 260°C,
Aufheizrate: 5°C/min

Massenspektrometer:

(a) Kratos MS 80 RFA

Ionisierungsenergie: 70 eV

(b) Hewlett Packard 5985 A

Ionisierungsenergie 70 eV

IV. Spezielle Arbeitsmethoden

1. Spigelia anthelmia (Kraut)

1.1. Inhaltsstoff-Screening

Für das Inhaltsstoff-Screening stellten wir aus 450 g gepulverter Droge einen Methanolextrakt her. Die Fraktionierung erfolgte nach dem im Allg. Teil I.2. angegebenen Verfahren.

1.2. Flüchtige Alkaloide

1.2.1. Extraktion

Soxhlet-Extraktion

500 g Droge wurden mit Methanol erschöpfend am Soxhlet extrahiert und anschließend einer Säure-Basenausschüttelung unterzogen: Die eingeeengte methanolische Lösung wurde in 1% iger HCl suspendiert und 15 Minuten am Magnetrührer extrahiert. Nach Filtration wurde der unlösliche Rückstand noch 2 mal mit HCl ausgezogen. Die vereinigten salzsauren Phasen wurden mit Dichlormethan ausgeschüttelt, bis die organische Phase nicht mehr gefärbt war (5 x). Die saure wässrige Lösung wurde mit 10% igem NH_3 auf pH 9 eingestellt und mit Dichlormethan (5 x) extrahiert. Nach Trocknen über Na_2SO_4 engten wir zur Trockene ein.

Perkolation

500 g gepulverte Droge wurden 24 Stunden mit 400 ml Ethanol mazeriert. Nach Beschicken des Perkulators extrahierten wir mit einer Tropfgeschwindigkeit von 20 Tröpf./min solange, bis der Ablauf fast farblos war (5 Tage). Der ethanolische Auszug wurde eingeeengt und eine Säure-Basenausschüttelung durchgeführt.

Wasserdampfdestillation

Insgesamt wurden 5 kg Droge einer Destillation unterworfen. Pro Destillationsgang wurden 300 g Droge mit 500 ml 10% iger Na_2CO_3 -Lösung durchfeuchtet und in einen 4 l Rundkolben gefüllt. Nach Zugabe von Wasser wurde der Kolben mit der Destillationsapparatur verbunden, die mit einem Dampfeinleitungsrohr versehen war. Das Destillat fingen wir in einer eisgekühlten, verdünnten HCl-Lösung auf. Nach 5 - 6 stündiger Destillationsdauer führten wir eine Säure-Basenausschüttelung mit Ether durch und erhielten so das gereinigte Destillat DSA.

Die jeweils erzielten Ausbeuten sind im Allg. Teil unter I.3.1.4. aufgeführt.

1.2.2. Isolierung der Substanzen SA 1 und SA 2 durch präparative HPLC

40 mg DSA wurden als 2% ige Lösung in zahlreichen Analysengängen in die HPLC eingespritzt. Die Peaks wurden aufgefangen und das Lösungsmittel vorsichtig ($<30^\circ\text{C}$) am Rotavapor abgezogen. Die Ausbeute an SA 1 betrug 8 mg, SA 2 konnte auf diese Weise nicht rein erhalten werden.

1.2.3. Anreicherung von Secologanin

Für den DC-Nachweis wurde der Methanolextrakt von *Spigelia* mit Dichlormethan ausgeschüttelt. Die DC erfolgte auf HPTLC-Platten in 2 Laufmittelsystemen (vgl. III.2.2.).

Rf(DC): 0.28 (LM: CHCl_3 :MeOH 4:1)

Rf(DC): 0.44 (LM: Aceton: CHCl_3 : H_2O 80:20:5)

1.2.3. Physikalische Daten

Verbindung SA 1 (= Isochinolin)

C_9H_7N (129.05785)
Rf(DC): 0.68 (LM: $CHCl_3$:MeOH 95:5)
UV(MeOH): $\lambda_{max.}$ = 258(sh), 267, 277(sh), 305, 320 nm
MS: GC/MS, Gerät (a)
m/e (rel. Int.%) = 129(100), 102(26), 75(12),
63(6), 51(18)
 1H -NMR: (80 MHz, $CDCl_3$, TMS int., 15 mg)
 δ = 7.55 - 7.92 ppm (5H, aromatische Protonen);
8.52 (d, 1H, J = 6 Hz, H-3); 9.27 (s, 1H, H-1)

Verbindung SA 2

MG 147
Rf(DC): 0.58 (LM: $CHCl_3$:MeOH 95:5)
UV(HPLC): $\lambda_{max.}$ = 265 nm
MS: GC/MS, Gerät (b)
m/e (rel. Int.%) = 147(20), 132(100), 117(6),
104(9), 91(7), 77(7), 63(5), 51(9)

1.3. Quartäre Alkaloide

Die Aufarbeitung erfolgte nach dem im Allg. Teil I.4.,
Abb. 11 angegebenen Schema.

1.3.1. Extraktion

500 g Droge wurden 2 Tage mit 80% igem Methanol am Magnet-
rührer extrahiert. Nach Einengen des Filtrats bis zur si-
rupartigen Konsistenz wurde der Rückstand in heißem Was-
ser aufgenommen und erneut filtriert. Anschließend wurde

je 5 mal mit Petrolether und Dichlormethan ausgeschüttelt. Nach Ansäuern der wässrigen Phase mit 2% iger HCl (pH 3) wurden die quartären Alkaloide durch Zugabe von 100 ml einer 4% igen Reinecke-Salz-Lösung gefällt. Nach 24 stündigem Stehenlassen bei 0 - 4°C war die Fällung vollständig. Der rötliche Niederschlag wurde abgenutscht, gründlich mit Wasser und Ether gewaschen und 2 Tage im Exsiccator getrocknet (Ausbeute: 800 mg).

Das Reineckat wurde in Aceton gelöst und auf eine Amberlite IRA-401 Anionenaustauschersäule (Cl^- , 20 - 50 mesh, Fa. Serva) (40 x 3 cm ID) aufgetragen. Die Elution erfolgte mit 700 ml Aceton:Wasser 1:1. Das Aceton wurde abdestilliert und die verbleibende wässrige Phase gefriergetrocknet (Ausbeute: 230 mg).

1.3.2. Reinigung

Die wässrige Lösung der quartären Alkaloidfraktion wurde auf eine Amberlite CG-50 I Kationenaustauschersäule (H^+ , 100 - 200 mesh, Fa. Serva) (20 x 1 cm ID) aufgetragen. Es wurde mit 500 ml Wasser gespült, dann wurden die quartären Alkaloide mit 400 ml 1M Essigsäure eluiert. Nach Einengen und Gefriertrocknen betrug die Ausbeute 100 mg.

1.3.3. Präparative DC

Durch präparative DC (Methode, vgl. IV.6.3.) im Laufmittel $\text{EtOAc:AcOH:H}_2\text{O}$ 70:25:25 konnten aus 40 mg quartärer Alkaloidfraktion 7 mg Cholin isoliert werden. Die Elution erfolgte mit Methanol.

1.3.4. Hydrolyse

18 mg quartäre Alkaloidfraktion wurden mit 2 - 3 ml 10% iger NaOH versetzt und ca. 20 Stunden bei Raumtemperatur stehengelassen. Anschließend wurde die eisgekühlte Lösung bis zur stark sauren Reaktion mit 10% iger HCl versetzt. Die Säuren wurden 3 mal mit Ethylacetat ausgeschüttelt. Nach Trocknen über Na_2SO_4 wurde das Lösungsmittel am Stickstoffstrom abgeblasen. Die saure wässrige Lösung wurde neutralisiert und Cholin, wie unter IV.1.3.2. beschrieben, isoliert.

1.3.5. Herstellung der BSTFA^{*}-Verbindungen (121)

Ca. 1 mg Vergleichssubstanz, bzw. 2 mg Ethylacetatausschüttelung (IV.1.3.4.) wurden mit 100 μl BSTFA versetzt und in Ampullen eingeschmolzen. Die Ampullen wurden 10 Minuten im Trockenschrank bei 125°C erhitzt. Nach Abkühlen konnten die Lösungen direkt in den Gaschromatograph eingespritzt werden.

1.3.6. Physikalische Daten

Cholin

$\text{C}_5\text{H}_{14}\text{N}$ (104.16)

Smp.: Reineckat: 295°C unter Zersetzung

Rf(DC): 0.1 (LM: EtOAc:AcOH:H₂O 70:25:25)

¹H-NMR des Acetats:

(80 MHz, DMSO-d₆, TMS int., 20 mg)

δ = 1.7 ppm (s, 3H, Acetat); 3.17 (s, 9H,

N-(CH₃)₃); 3.4 (m, 2H, -CH₂-); 3.7 (m, 2H, -CH₂-O-)

* bis(Trimethylsilyl)-trifluoro-acetamid

1.4. Flavonoide und Phenolcarbonsäuren

1.4.1. Extraktion und Anreicherung

50 g Extrakt (aus 200 g Droge, Soxhlet, Methanol) wurden in Wasser suspendiert und sukzessive mit Dichlormethan, Ethylacetat und n-Butanol ausgeschüttelt. Die Ethylacetatfraktion (2.5 g) diente zur Prüfung auf Phenolcarbonsäuren, die Butanolausschüttelung (4.4 g) zur Untersuchung der Flavonoide. Durch präparative DC (LM: EtOAc:AcOH: HCOOH:H₂O 100:11:11:26, Elution: MeOH) wurden nach der unter IV.6.3. beschriebenen Methode angereicherte Fraktionen der Hauptflavonoide hergestellt.

1.4.2. Hydrolysen

Trifluoressigsäure-Hydrolyse

2 - 5 mg Substanz wurden mit 1 - 2 ml Trifluoressigsäure 2 Stunden am Dampfbad erhitzt. Durch wiederholtes Abotrieren mit Methanol wurde die Trifluoressigsäure entfernt. Der Rückstand wurde in Wasser suspendiert und 3 mal mit Ethylacetat ausgeschüttelt. Der Zuckernachweis wurde aus der wässrigen, der Aglykonnachweis aus der Ethylacetat-Phase durchgeführt.

Mikrohydrolyse auf der DC-Platte

Durch präparative DC angereicherte Fraktionen wurden auf 2 Kieselgelplatten aufgetragen. Die Platten wurden 45 Minuten in eine DC-Kammer gestellt, in der sich ein mit HCl konz. gefülltes Becherglas befand. Anschließend wurden die Platten bis zur vollständigen Vertreibung der HCl unter dem Abzug geöffnet (2 Stunden). Nach Auftragen der Vergleichssubstanzen wurden die Platten im Zucker- und Aglykonlaufmittel entwickelt.

2. Spigelia anthelmia (Samen)

Die Untersuchung der Droge erfolgte nach dem für Spigelia anthelmia (Kraut) beschriebenen Alkaloid-Screening (vgl. Allg. Teil I.2.3.). 20 g Droge wurden eingesetzt.

3. Spigelia humboldtiana (Kraut)

Die Untersuchung erfolgte ebenfalls nach dem im Allg. Teil unter I.2.3. beschriebenen Alkaloid-Screening. 20 g Droge wurden extrahiert.

4. Valeriana officinalis

Isolierung von Actinidin

Durch Destillation von 240 g Baldrianwurzel nach dem für Spigelia beschriebenen Verfahren (IV.1.2.1.) konnten 6 mg Actinidin in DC-reiner Form erhalten werden.

$C_{10}H_{13}N$ (147.10480)

Rf(DC): 0.58 (LM: $CHCl_3$:MeOH 95:5)

UV(MeOH): $\lambda_{max.} = 265 \text{ nm}$

MS: GC/MS, Gerät (b)

m/e (rel. Int.%) = 147(49), 132(100), 117(46),
103(45), 91(6), 77(10), 63(6), 51(10)

1H -NMR: (80 MHz, $CDCl_3$, TMS int., 6 mg)

$\delta = 1.31 \text{ ppm}$ (d, 3H, J = 7 Hz, CH_3);

2.22 (s, 3H, CH_3 -Ar); 3.22 (m, 1H, H-7);

8.20 und 8.25 (s, s, je 1H, H-1, H-3)

5. Synthesen

5.1. 1-Methyl-1,2,3,4-tetrahydroisochinolin

Herstellung von 1-Methyl-3,4-dihydroisochinolin (118):
0.02 Mol (0.82 g) Acetonitril wurden zu 0.02 Mol (5.2 g) Zinn-(IV)-chlorid gegeben. Nach Beendigung der exothermen Reaktion wurden 4.1 g β -Chlorethylbenzol zugefügt. Das Reaktionsgemisch wurde 2.5 Stunden bei 100°C erhitzt. Nach Abkühlen wurde mit 20% iger NaOH (alkalische Reaktion) versetzt und 3 mal mit Ether ausgeschüttelt. Die Etherphasen wurden über Na_2SO_4 getrocknet und eingengt. Die Ausbeute betrug 0.9 g (35% der theoretischen Ausbeute). Nach Vakuumdestillation (130°C, 15 Torr) von 300 mg Rohprodukt erhielten wir 200 mg gereinigte Verbindung.

30 mg des Dihydroderivates in 4 ml Methanol wurden mit 2 Spatelspitzen NaBH_4 versetzt (alkalische Reaktion) und 3 Stunden stehengelassen. Dann wurde vorsichtig mit Essigsäure angesäuert und mit Ether gewaschen. Nach Alkalisieren mit NH_3 wurde die freie Base mit Ether ausgeschüttelt. Die Umsetzung erfolgte quantitativ.

$\text{C}_{10}\text{H}_{13}\text{N}$ (147.10480)
Rf(DC): Start (LM: CHCl_3 :MeOH 95:5)
MS: GC/MS, Gerät (a)
m/e (rel. Int.%) = 147(11), 132(100), 117(18), 105(8), 91(5), 77(6), 65(5)
 $^1\text{H-NMR}$: (80 MHz, CDCl_3 , TMS int., 20 mg)
 δ = 1.47 ppm (d, 3H, J = 7 Hz, CH_3); 4.12 (q, 1H, J = 7 Hz, H-1); 7.0 - 7.25 (4H, aromatische Protonen)

5.2. 1,2-Dimethylindolin (119)

Zu einer am Magnetrührer unter Stickstoffbegasung bei 15 - 17°C gerührten Lösung von 800 mg 1,2-Dimethylindol in 15 ml Eisessig wurde 1 g NaCNBH₃ gegeben. Die Lösung wurde 2 Stunden bei 15°C gerührt und anschließend im Eisbad mit NaOH Plättchen alkalisiert. Die alkalische Lösung wurde 4 mal mit Ether ausgeschüttelt. Die vereinigten Etherextrakte wurden mit Wasser gewaschen und nach Trocknen über Na₂SO₄ eingeeengt. Die Ausbeute betrug 620 mg.

C₁₀H₁₃N (147.10480)

Rf(DC): Front (LM: CHCl₃:MeOH 95:5)

MS: (4 kV, 70 eV, 50 µA)

m/e (rel. Int.%) = 147(70), 132(100), 117(34),
103(5), 91(8)

¹H-NMR: (80 MHz, CDCl₃, TMS int., 30 mg)

δ = 1.32 ppm (d, 3H, J = 7 Hz, CH₃); 2.71

(s, 3H, N-CH₃); 6.35 - 7.12 (4H, aromatische
Protonen)

5.3. 3,3-Dimethylacryloylcholin (65)

2 g 3,3-Dimethylacryloylchlorid wurden in 5 ml Pyridin gelöst und mit 2.5 g 2-Dimethylaminoethanol versetzt. Nach zweitägigem Stehenlassen bei Raumtemperatur wurde der Niederschlag abgenutscht und mit Ether und Aceton gewaschen. Der Rückstand wurde in Wasser aufgenommen, alkalisiert und 3 mal mit Dichlormethan ausgeschüttelt (90 mg).

60 mg davon wurden in 1 ml Methanol gelöst und mit 100 µl Methyliodid versetzt. Nach 24 Stunden wurde überschüssiges Methyliodid abotiert, der Rückstand in Wasser aufgenommen und mit Dichlormethan ausgeschüttelt. Die wässrige Phase wurde gefriergetrocknet und über präparative DC (LM: EtOAc:AcOH:H₂O 70:25:25, Eluens: MeOH) gereinigt (25 mg).

$C_{10}H_{20}NO_2$ (186.17)

Rf(DC): 0.34 (LM: EtOAc:AcOH:H₂O 70:25:25)

UV(MeOH): $\lambda_{max.} = 220$ nm

IR(KBr): $\nu = 3000, 2920, 1710, 1570, 1430, 1230, 1140, 1090, 1045, 1005, 920, 870$ cm⁻¹

¹H-NMR: (80 MHz, DMSO-d₆, TMS int., 20 mg)
 $\delta = 1.8$ ppm (d, 3H, J = 2 Hz, CH₃); 2.15
(d, 3H, J = 2 Hz, CH₃); 3.17 (s, 9H, N-(CH₃)₃);
4.0 (m, 2H, -CH₂-); 4.4 (m, 2H, -CH₂-O-);
5.7 (m, 1H, -CH=C-)

6. Funtumia africana (Rinde)

Die Untersuchung erfolgte nach dem im Allg. Teil II.3.,
Abb. 25 skizzierten Schema.

6.1. Herstellung der Rohalkaloidfraktion F_G

Extraktion

600 g gepulverte Droge wurden mit Petrolether am Soxhlet entfettet. Der Petroletherextrakt wurde verworfen. Die Droge wurde getrocknet und anschließend mit Methanol 4 Tage am Soxhlet extrahiert. Nach Einengen der methanolischen Lösung blieben 50 g Trockenextrakt zurück. Damit wurde, wie unter IV.1.2.1. beschrieben, eine Säure-Basenausschüttelung durchgeführt. Der so erhaltene klebrige Extrakt wurde in Dichlormethan aufgenommen und bis zur Trübung mit n-Hexan versetzt. Nach Abdunsten des Lösungsmittels erhielten wir die Rohalkaloidfraktion F_G in pulverisierter Form (1.7 g).

6.2. Säulenchromatographie

Adsorbens:

Kieselgel 60 Merck, Korngröße unter 0.063 mm (feiner als 230 mesh, ASTM), Art.Nr. 7729, 200 g

1.7 g des Rohalkaloidextraktes F_G wurden auf eine Kieselgelsäule (40 x 3.5 cm ID) aufgetragen. Die Elution erfolgte mit $CHCl_3:MeOH$ 85:15. Die Tropfgeschwindigkeit betrug 20 - 30 Trpf./min. Das Eluat wurde in Fraktionen zu je 10 ml aufgefangen. Nach dünnschichtchromatographischer Prüfung wurden identische Fraktionen vereinigt und zur Trockene eingengt. Folgende Fraktionen und Ausbeuten wurden erhalten:

1 - 52	verworfen	-
53 - 72	Zonen oberhalb FAN 1	60 mg
73 - 78	FAN 1 angereichert	50 mg
79 - 91	FAN 1 stark angereichert	70 mg
92 - 95	FAN 1 + FAN 2	32 mg
96 - 114	FAN 2 angereichert	60 mg

6.3. Isolierung der Alkaloide FAN 1 und FAN 2 durch präparative DC

Durch die Säulenchromatographie vorgereinigte Fraktionen wurden in Methanol p.a. aufgenommen und auf Kieselgelplatten im Laufmittel $CHCl_3:MeOH$ 85:15 chromatographiert. Es konnten bis zu 5 mg/Platte aufgetragen werden.

Nach Entwickeln wurden die Platten kalt gefönt, die Zonen im UV 254 markiert und ausgekratzt. Das Kieselgel wurde 3 x 20 Minuten mit DCM:MeOH 1:1 auf dem Magnetrührer eluiert. Dann wurde abdekantiert und durch eine Glasfritte G 4 filtriert. Das Filtrat wurde am Rotavapor einrotiert, in Dichlormethan aufgenommen und membranfiltriert (Sartorius Typ SM, Porengröße 0.45 µm). Dadurch konnten letzte Spuren von Kieselgel entfernt werden. Bei Aufarbeitung von Fraktion 96 - 114 konnten wir 10 mg FAN 2, bei Verwendung von Fraktion 79 - 91 17 mg FAN 1 gewinnen.

6.4. HPLC-Fraktionierung des Alkaloids FAN 1

FAN 1 wurde durch präparative HPLC in 2 Peaks getrennt, die mit Retentionszeiten von 20 und 24 Minuten erschienen. Pro Analysengang konnten 0.25 - 0.5 mg (entsprechend 50 - 100 µl) Gemisch eingespritzt werden. Die Peaks wurden aufgefangen und das Lösungsmittel bis auf ca. 50 ml am Rotationsverdampfer abgezogen. Die verbleibende wässrige Phase wurde mit Dichlormethan ausgeschüttelt, über Na₂SO₄ getrocknet und eingeeengt. Die Ausbeute betrug bei 13 mg eingesetztem Gemisch 4 mg FAN 1/1 und 6 mg FAN 1/2.

6.5. Darstellung eines Dihydrochinazoliniumsalzes des Alkaloidgemisches FAN 1 (94)

12.1 mg o-Aminobenzaldehyd wurden in 6.4 ml Citratpuffer (pH 4.6) unter Schütteln bei 40°C gelöst. Nach Abkühlen wurden ca. 3 ml davon zu einer Lösung von 1.8 mg FAN 1 in 50 µl 0.1N HCl gegeben. Die anfängliche Gelbfärbung verstärkte sich innerhalb von 5 - 10 Minuten zu einem kräftigen Gelb-Orange. Auf Zugabe einer kalt gesättigten Pikrinsäurelösung entstand spontan ein Niederschlag.

6.6. Darstellung des Diacetates von Alkaloid FAN 1/1

1 mg FAN 1/1 wurde mit 0.2 ml Pyridin und 0.4 ml Acetanhydrid versetzt und 20 Stunden unter Feuchtigkeitsausschluß bei Raumtemperatur stehengelassen. Durch eine Probe-DC direkt aus dem Reaktionsgemisch ließ sich die Vollständigkeit der Umsetzung überprüfen. Nach Zugabe von 3 ml eisgekühltem Wasser wurde mit festem Na_2CO_3 alkalisiert (pH 10) und 3 mal mit Chloroform ausgeschüttelt. Nach Trocknen über Na_2SO_4 wurde einrotiert. Reste von Pyridin konnten durch mehrmaliges Abrotieren mit Benzol entfernt werden. Die Endreinigung erfolgte durch präparative DC nach der unter IV.6.3. beschriebenen Methode im Laufmittel $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}$ 20:1. Zur Desorption des Diacetates vom Kieselgel wurde mit $\text{DCM}:\text{MeOH}$ 1:1 eluiert.

6.7. Darstellung des Acetonids von Alkaloid FAN 2 (111)

Lösung 1: 0.5 ml 2,2-Dimethoxypropan in 100 ml Aceton p.a.

Lösung 2: p-Toluolsulfonsäure 1% ig in Aceton p.a.

1 mg FAN 2 wurde mit 1 ml Lösung 1 und 100 μl Lösung 2 versetzt. Das Reaktionsgemisch wurde 16 Stunden bei Raumtemperatur stehengelassen. Nach Zugabe eines Tropfens Pyridin wurde zur Trockene einrotiert und anschließend mit etwas Eiswasser versetzt. Da kein Niederschlag auftrat, wurde die wässrige Phase mit Na_2CO_3 -Lösung versetzt und 3 mal mit Dichlormethan ausgeschüttelt. Die präparative DC zur Endreinigung des Acetonids erfolgte im Laufmittel $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}$ 85:15 mit $\text{DCM}:\text{Aceton}$ 1:1 als Eluens.

6.8. Physikalische Daten

Alkaloid FAN 1/1

$C_{21}H_{27}NO_2$ (325.20417)

gef.: 73.6% C, 8.3% H, 4.2% N

ber.: 77.5% C, 8.3% H, 4.3% N

Smp.: 110°C

Rf(DC): 0.60 (LM: $CHCl_3$:MeOH 85:15)

$[\alpha]_D^{22}$: + 50 ($c = 0.104$ in $CHCl_3$)

UV(MeOH): $\lambda_{max.} = 244.5$ nm ($\epsilon = 13622$)

IR(KBr): $\nu = 3200, 2920, 2860, 1660, 1615, 1600, 1455, 1375, 1295, 1100, 1040, 885, 810, 750$ cm^{-1}

MS: (4 kV, 70 eV, ST 210°C, 50 μA)

m/e (rel. Int.%) = 325(86), 307(68), 204(88), 186(34), 172(46), 159(88), 121(100), 122(93), 91(70), 77(49), 55(51)

CD: (Dioxan, $c = 0.35$ mMol/l, $d = 1$ cm)

$\lambda_{max.}(\Delta\epsilon) = 346$ nm (-0.18)

1H -NMR: (500 MHz, $CDCl_3$, TMS int., 2 mg)

$\delta = 1.25$ ppm (s, 3H, CH_3 -19); 1.39 (d, 3H, $J = 7$ Hz, CH_3 -21); 3.98 (1H, $W_{1/2} = 5$ Hz, H-12B); 4.15 (m, 1H, H-20); 6.11 (d, 1H, $J = 2$ Hz, H-4); 6.26 (dd, 1H, $J_1 = 10.1$ Hz, $J_2 = 2$ Hz, H-2); 7.05 (d, 1H, $J = 10.1$ Hz, H-1); 7.53 (d, 1H, $J = 2$ Hz, H-18)

(200 MHz, $DMSO-d_6$, TMS int., 3 mg)

Ausschnitt des Spektrums

$\delta = 3.68$ ppm (ddd, 1H, $J_1 = 4$ Hz, $J_2 = J_3 = 2$ Hz, H-12B); 4 (m, 1H, H-20); 4.94 (d, 1H, $J = 4$ Hz, 12 α -OH); 6.02 (d, 1H, $J = 2$ Hz, H-4); 6.13 (dd, 1H, $J_1 = 10$ Hz, $J_2 = 2$ Hz, H-2); 7.2 (d, 1H, $J = 10$ Hz, H-1); 7.6 (d, 1H, $J = 2$ Hz, H-18)

Diacetat von Alkaloid FAN 1/1

MS: (4 kV, 70 eV, ST 210°C, 50 μ A)
m/e (rel. Int.%) = 427(2), 409(8), 385(1),
367(39), 307(93), 292(37), 280(74), 264(47),
251(31), 207(27), 186(52), 159(100), 121(97)
91(73)

Alkaloid FAN 1/2

C₂₁H₂₇NO₂ (325.20417)
Smp.: 210 -215°C
Rf(DC): 0.60 (LM: CHCl₃:MeOH 85:15)
[α]_D²²: 0 (c = 0.144 in CHCl₃)
UV(MeOH): $\lambda_{\text{max.}}$ = 246 nm (ϵ = 11285)
IR(KBr): ν = 3200, 2920, 2860, 1665, 1625, 1600, 1450,
1405, 1375, 1295, 1245, 1160, 1060, 1040, 985,
930, 885 cm⁻¹
MS: (4 kV, 70 eV, ST 220°C, 50 μ A)
m/e (rel. Int.%) = 325(100), 310(53), 307(36),
296(43), 286(36), 204(94), 190(90), 163(93),
122(98), 121(95), 91(86), 55(90)
CD: (Dioxan, c = 0.35 mMol/l, d = 1cm)
 $\lambda_{\text{max.}}$ ($\Delta\epsilon$) = 346 nm (+0.24), 354 (+0.38),
376 (+0.39)
¹H-NMR: (500 MHz, CDCl₃, TMS int., 2 mg)
 δ = 1.38 ppm (s, 3H, CH₃-19); 1.38 (d, 3H,
J = 7 Hz, CH₃-21); 4.1 (m, 2H, H-11 β , H-20);
6.13 (d, 1H, J = 2 Hz, H-4); 6.19 (dd, 1H,
J₁ = 10.2 Hz, J₂ = 2 Hz, H-2); 7.50 (d, 1H,
J = 2.5 Hz, H-18); 7.80 (d, 1H, J = 10.2 Hz,
H-1)

(80 MHz, DMSO-d₆, TMS int., 4.8 mg)
 δ = 1.28 ppm (dd, 3H, J_1 = 7 Hz, J_2 = 2 Hz, CH₃-21); 1.35 (s, 3H, CH₃-19); 4.0 (m, 2H, H-11 β , H-20); 4.9 (d, 1H, J = 6 Hz, 11 α -OH); 6.1 (dd, 1H, J_1 = 10 Hz, J_2 = 2 Hz, H-2); 6.1 (d, 1H, J = 2 Hz, H-4); 7.6 (1H, H-18); 7.8 (d, 1H, J = 10 Hz, H-1)

D₂O-Austausch:

Nach D₂O-Austausch verschwand das Signal bei 4.9 ppm, das Signal bei 4.0 ppm wurde schärfer:

vor D₂O: $W_{1/2}$ = 21 Hz

nach D₂O: $W_{1/2}$ = 18 Hz

Alkaloid FAN 2

C₂₁H₂₇NO₃ (341.199082)

gef.: 71.9% C, 8.2% H, 3.6% N

ber.: 73.9% C, 7.9% H, 4.1% N

Smp.: 240 - 245°C

Rf(DC): 0.53 (LM: CHCl₃:MeOH 85:15)

UV(MeOH): $\lambda_{\max.}$ = 246 nm (ϵ = 12862)

IR(KBr): ν = 3500, 3140, 2920, 2850, 1656, 1615, 1600, 1460, 1445, 1418, 1405, 1370, 1295, 1270, 1240, 1150, 1120, 1095, 1050, 1010, 890, 870, 810, 690 cm⁻¹

MS: (4 kV, 70 eV, ST 210°C, 50 μ A)
 m/e (rel. Int.%) = 341(88), 323(8), 312(16), 220(20), 147(46), 122(30), 121(100), 91(70), 77(52), 55(96)

CD: (Dioxan, c = 0.3 mMol/l, d = 1cm)
 $\lambda_{\max.}(\Delta\epsilon)$ = 346 nm (+0.52), 360 (+0.65), 375 (+0.46)

$^1\text{H-NMR}$: (500 MHz, CDCl_3 , TMS int., 4 mg)
 δ = 1.37 ppm (s, 3H, CH_3 -19); 1.38 (d, 3H, J = 7 Hz, CH_3 -21); 2.45 (ddd, 1H, J_1 = 10 Hz, J_2 = 6 Hz, J_3 = 3 Hz, H-17); 2.7 (OH); 3.82 (d, 1H, J = 2.5 Hz, H-12B); 4.01 (dd, 1H, J_1 = 10.5 Hz, J_2 = 2.5 Hz, H-11B); 4.11 (qdd, 1H, J_1 = 7 Hz, J_2 = 6 Hz, J_3 = 2.5 Hz, H-20); 6.13 (d, 1H, J = 2 Hz, H-4); 6.19 (dd, 1H, J_1 = 10.3 Hz, J_2 = 2 Hz, H-2); 7.43 (d, 1H, J = 2.5 Hz, H-18); 7.79 (d, 1H, J = 10.3 Hz, H-1)

Nach D_2O -Austausch verschwand das Signal bei 2.7 ppm.

7. Funtumia africana (Blätter)

Die Herstellung der Alkaloidrohfraktion erfolgte nach der unter IV.6.1. beschriebenen Vorschrift, wobei allerdings die Petroletherextraktion entfiel. Aus 135 g gepulverter Droge erhielten wir 560 mg Alkaloidfraktion.

8. Holarrhena antidysenterica (Rinde)

Die Herstellung der Alkaloidrohfraktion erfolgte nach dem unter IV.6.1. beschriebenen Verfahren. Die Petroletherextraktion entfiel auch hier. Die Ausbeute betrug bei 25 g eingesetztem Rindenmaterial 200 mg eines klebrigen Extraktes.

V. Pharmakologische Untersuchungen*

Eine ausführliche Beschreibung der jeweiligen Versuchsanordnungen findet sich im Methodenbericht der Fa. Madaus (120).

1. Prüfung auf Herzwirksamkeit am isolierten Meerschweinchenvorhof

Die isolierten Vorhöfe wurden im Organbad fixiert. Der linke Vorhof wurde zusätzlich mit einer Reizelektrode versehen und während des Versuchs elektrisch stimuliert. Die zu prüfende Substanz wurde nach einer Wartezeit von 15 Minuten als Injektion von möglichst kleinem Volumen dem Organbad zugeführt.

Organbad: 25 ml, carbogenisierte Tyrodelösung, 37°C

Konzentrationen: 10 - 100 µg/ml Badflüssigkeit

Badzugabe: 100 µl

Kontrollsubstanz und Lösungsmittel der Prüfsubstanzen:

PÄG 400 (Badzugabe: 100 µl)

Frequenz (gereizt): 60 Impulse/min, 1 ms

2. In vivo Bestimmung der Herzfrequenz und des peripheren Blutdrucks an Ratte und Meerschweinchen

Die Bestimmung erfolgte an narkotisierten Ratten (Wistar, SPF) und Meerschweinchen (Pirbright, white) (n = 6 - 10).

Dosierung: 10 - 30 mg/0.5 ml/kg/i.v.

Lösungsmittel: PÄG 400

Injektionsgeschwindigkeit: 0.05 ml/min

Kontrollsubstanz: PÄG 400

Dosierung: 0.5 ml/kg/i.v.

Narkose: Urethan (Fa. Merck), 1.5 g/3 ml/kg/i.p.

* Die Untersuchungen wurden von der Fa. Madaus, Köln, durchgeführt.

L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S

- 1) U.S.P. IX (The Pharmacopoeia of the United States of America) (1916)
- 2) HOPPE, H.A., Drogenkunde, Bd. 1, Angiospermen, 8. Auflage, de Gruyter-Verlag, Berlin (1975)
- 3) MADAUS, G., Lehrbuch der biologischen Heilmittel, Abt. I, Heilpflanzen, Bd. 3, S. 2589, Georg Thieme Verlag, Leipzig (1938)
- 4) BERGER, F., Handbuch der Drogenkunde, Bd. 4, S. 488, Verlag Wilhelm Maudrich, Wien (1954)
- 5) THOMS, H., Handbuch der Pharmazie, Bd. 5, S. 1452, Verlag Urban & Schwarzenberg, Berlin Wien (1931)
- 6) BOORSMA, W.G., Meded. Lands. Plantent. 18, 17 (1896), 31, 134 (1899), zit. nach (9)
- 7) WEHMER, C., Die Pflanzenstoffe, Bd. 2, 2. Auflage, S. 961, Gustav Fischer Verlag, Jena (1931)
- 8) ROTH, L., DAUNDERER, M. und KORMANN, K., Giftpflanzen-Pflanzengifte, ecomed, Landsberg München (1984)
- 9) HEGNAUER, R., Chemotaxonomie der Pflanzen, Bd. 4, Birkhäuser Verlag, Basel und Stuttgart (1964)
- 10) DUDLEY, Amer. Chem. J. 1, 154 (1879/80), zit. nach (9)
- 11) OSOL, A. und FARRAR, G., The Dispensatory of the United States of America, 25. Ausgabe, S. 1868, J.B. Lippincolt Company (1955)
- 12) DRAGENDORFF, G., Die Heilpflanzen der verschiedenen Völker und Zeiten, S. 532, Verlag Werner Fritsch, München (1967)
- 13) BLOHM, H., Poisonous Plants of Venezuela, S. 75, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft m.b.H. (1962)
- 14) SIEVERS, A.F., ARCHER, W.A., MOORE, R.H. und MCGOVAN, E.R., J. Econ. Entomol. 42, 549 (1949)
- 15) JOHNSON, S.W., Trop. Agric. (Trinidad) 40, 165 (1963)
- 16) HAHNEMANN, S., Reine Arzneimittellehre, Bd. 5, Leipzig, (1830), Nachdruck Karl F. Haug Verlag, Ulm/Donau (1955)
- 17) THE HOMEOPATHIC PHARMACOPOEIA OF THE U.S., 6. Ausgabe, S. 532 (1941)
- 18) HAB 34, 2. Auflage, Verlag Willmar Schwabe, Leipzig (1934)
- 19) HOMÖOPATHISCHES ARZNEIBUCH 1, 3. Nachtrag 1985, S.395, Govi Verlag GmbH, Frankfurt
- 20) SALLER, K., Lehrbuch der homöopathischen Arzneimittellehre, S. 291, Karl F. Haug Verlag, Saulgau/Württ. (1952)
- 21) MEZGER, J., Gesichtete homöopathische Arzneimittel-lehre, S. 659, Karl F. Haug Verlag, Saulgau/Württ. (1950)
- 22) CHARETTE, G., Homöopathische Arzneimittellehre für die Praxis, S. 427, Hippokrates Verlag, Stuttgart (1958)
- 23) LEESER, O., J. Am. Inst. Homeopathy 29, 730 (1936)

- 24) Homöopathisches Repetitorium, Deutsche Homöopathie-Union, Karlsruhe (1985)
- 25) BÖHM, K., Die Flavonoide, Editio Cantor KG, Aulendorf/Württ. (1967)
- 26) HABERMEIER, H., Dissertation Universität München (1980)
- 27) KEDDE, D.L., Pharm. Weekbl. 82, 741 (1947)
- 28) TAKEDA, K., HARA, S., WADA, A. und MATSUMOTO, N., J. Chromatogr. 11, 562 (1963)
- 29) BRÜNING, R., Dissertation Universität München (1979)
- 30) TRAVELL, J., J. Pharm. Sci. 33, 684 (1934)
- 31) PAECH, K. und TRACEY, M.V., Moderne Methoden der Pflanzenanalyse, Bd. 3, Springer Verlag, Berlin Göttingen Heidelberg (1955)
- 32) FARNSWORTH, N.R., J. Pharm. Sci. 55, 225 (1966)
- 33) MUNIER, R. und MACHEBOEUFF, H., Soc. Chim. Biol. 33, 846 (1951)
- 34) WAHLUND, K.G., J. Chromatogr. 115, 411 (1975)
- 35) TRINLER, W.A. und REULAND, D.J., J. Forensic Sci. Soc. 15, 153 (1975), zit. nach VERPOORTE, R. und BAERHEIM SVENDSON, A., Chromatography of Alkaloids, Teil 2, Elsevier, Amsterdam Oxford New York Tokio (1984)
- 36) SAMPLE, S.D., LIGHTNER, D.A., BUCHARDT, O. und DJERASSI, C., J. Org. Chem. 32, 997 (1967)
- 37) PORTER, Q.N. und BALDAS, J., Mass Spectrometry of Heterocyclic Compounds, Wiley-Interscience, New York London Sydney Toronto (1971)
- 38) RÖMPP, H., Chemie Lexikon, Bd. 2, 5. Auflage, S. 2379, Franckh'sche Verlagshandlung, Stuttgart (1962)
- 39) DONG, M., SCHMELTZ, J., JACOBS, E. und HOFFMANN, D., J. Anal. Toxicol. 2, 21 (1978), zit. nach C.A. 88, 133429 k (1978)
- 40) MERLI, F., WIESLER, D., MASKARINEC, M.P., NOVOTNY, M., VASSILAROS, D.L. und LEE, M.L., Anal. Chem. 53, 1929 (1981)
- 41) SHAMMA, M., The Isoquinoline Alkaloids, Academic Press, New York and London (1972)
- 42) STENHAGEN, E., ABRAHAMSSON, S. und McLAFFERTY, F.W., Registry of Mass Spectral Data, Bd. 1, John Wiley & Sons, New York London Sydney Toronto (1974)
- 43) HELLER, S.R. und MILNE, G.W.A., EPA/NIH Mass Spectral Data Base, Bd. 1, U.S. Department of Commerce, National Bureau of Standards (1978)
- 44) SAKAN, T., FUJINO, A., MURAI, F., BUTSUGAN, Y. und SUZUI, A., Bull. Chem. Soc. Jpn. 32, 315 (1959)
- 45) TORSELL, K. und WAHLBERG, K., Acta Chem. Scand. 21, 53 (1967)
- 46) GROSS, D., EDNER, G. und SCHÜTTE, H.R., Arch. Pharm. 304, 19 (1971)
- 47) RANIERI, R.L. und McLAUGHLIN, J.L., J. Chromatogr. 111, 234 (1975)
- 48) KODICEK, E. und REDDI, K.K., Nature 168, 475 (1951)
- 49) MANSKE, R.H.F., The Alkaloids, Bd. 16, Academic Press, New York San Francisco London (1977)

- 50) SCHÜTTE, H.R., Biosynthese niedermolekularer Naturstoffe, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart (1982)
- 51) LIST, P.H. und MENSSEN, H.G., Arch. Pharm. 292, 260 (1959)
- 52) CLAUSEN, S., OLSEN, O. und SØRENSEN, H., Phytochemistry 21, 917 (1982)
- 53) GUGGENHEIM, M., Die biogenen Amine, Verlag S. Karger, Basel New York (1951)
- 54) THAA, H., Pharmazie 8, 263 (1953)
- 55) JENDEN, D.J., HANIN, J. und LAMB, S.I., Anal. Chem. 40, 125 (1968)
- 56) SZILAGYI, A., SCHMIDT, D.E. und GREEN, J.P., Anal. Chem. 40, 2009 (1968)
- 57) STAVINOH, B. und RYAN, L.C., J. Pharmacol. Exptl. Therap. 150, 231 (1965)
- 58) PAECH, K. und TRACEY, M.V., Moderne Methoden der Pflanzenanalyse, Bd. 4, Springer Verlag, Berlin Göttingen Heidelberg (1955)
- 59) WHITTAKER, V.P., Biochem. Pharmacol. 71, 32 (1959)
- 60) NEUWALD, F., Arch. Pharm. 285, 459 (1952)
- 61) KRZACZEK, T., Ann. Univ. Mariae Curie-Sklodowska, Sect. D, 32, 281 (1977), zit. nach C.A. 89, 56433 (1977)
- 62) HEGNAUER, R., Chemotaxonomie der Pflanzen, Bd. 3, Birkhäuser Verlag, Basel und Stuttgart (1964)
- 63) PAGANI, F. und ROMUSSI, G., Farmaco Ed. Sci. 24, 257 (1969)
- 64) GMELIN, R. und KJAER, A., Phytochemistry 9, 667 (1970)
- 65) GMELIN, R. und MÖHRLE, H., Arch. Pharm. 300, 176 (1967)
- 66) PAGANI, F., J. Nat. Prod. 45, 649 (1982)
- 67) KAVALALI, G. und AKCASU, A., J. Nat. Prod. 48, 495 (1985)
- 68) MABRY, T.J., MARKHAM, K.R. und THOMAS, M.B., The Systematic Identification of Flavonoids, Springer Verlag, Berlin Heidelberg New York (1970)
- 69) HARBORNE, J.B., MABRY, T.J. und MABRY, H., The Flavonoids, Chapman and Hall, London (1975)
- 70) BARLOW, R.B., Introduction to Chemical Pharmacology, Methuen & Co LTD, London, John Wiley & Sons Inc., New York (1964)
- 71) SEKUL, A.A. und HOLLAND, W.C., J. of Pharmacol. 133, 313 (1961)
- 72) SEKUL, A.A. und HOLLAND, W.C., J. of Pharmacol. 132, 171 (1960)
- 73) FORTH, W., HENSCHLER, D. und RUMMEL, W., Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie, Bibliographisches Institut Mannheim Wien Zürich, B.I.-Wissenschaftsverlag (1984)
- 74) GREVEL, J., Dissertation Universität München (1982)
- 75) GOUTAREL, R., Les alcaloides stéroïdiques des Apocynacées, Hermann, Paris (1964)
- 76) ZECHMEISTER, L., Fortschritte in der Chemie organischer Naturstoffe, Bd. 24, Springer Verlag, Wien New York (1966)

- 77) BERHAUT, J., Flore illustrée du Sénégal, Bd. 1, S.381, Gouvernement du Sénégal, Ministère du Développement rural, Direction des eaux et forêts, Dakar (1971)
- 78) IRVINE, F.R., Woody Plants of Ghana, Oxford University Press (1961)
- 79) MANSKE, R.H.F., The Alkaloids, Bd. 9, Academic Press, New York San Francisco London (1967)
- 80) JANOT, M.-M., KHUONG-HUU, Q. und GOUTAREL, R., Compt. rend. 250, 2445 (1960)
- 81) DALZIEL, J.M., The Useful Plants of West Tropical Africa, London (1937), zit. nach (75)
- 82) ACTON, H.W. und CHOPRA, R.N., Indian Med. Gaz. 64, 481 (1929), zit. nach (75)
- 83) STEPHENSON, R.P., Brit. J. Pharmacol. 3, 237 (1948)
- 84) ODENTHAL, K.P. und GÖRLER, K., Erster Gesamtkongress der Pharmazeutischen Wissenschaften in München, 17. - 20. 4. 1983
- 85) LABLER, R. und CERNY, V., Coll. Czech. Chem. Commun. 28, 2932 (1963)
- 86) SCHREIBER, K., AURICH, O. und OSSKE, G., J. Chromatogr. 12, 63 (1963)
- 87) BOLL, P.M. und ANDERSEN, B., Planta med., 10, 421 (1962)
- 88) METHUEWS, J.S., Biochim. Biophys. Acta 69, 163 (1965)
- 89) MEHLITZ, A., GIERSCHNER, K. und MINAS, T., Chem. Ztg. 87, 573 (1963)
- 90) FIESER, L. und FIESER, M., Steroide, Verlag Chemie, Weinheim-Bergstraße (1961)
- 91) TSCHESCHE, R. und OCKENFELS, H., Chem. Ber. 97, 2326 (1964)
- 92) VETTER, V., LONGEVIALLE, P., KHUONG-HUU-LAINE, F., KHUONG-HUU, Q. und GOUTAREL, R., Bull. Soc. Chim. Fr. 1324 (1963)
- 93) DOLEJS, L., HANUS, V., CERNY, V. und SORM, T., Coll. Czech. Chem. Commun. 28, 1584 (1963)
- 94) SCHÖPF, C. und OECKLER, F., Liebigs Ann. Chem. 523, 1 (1936)
- 95) BUDZIKIEWICZ, H., DJERASSI, C. und WILLIAMS, D.H., Structure Elucidation of Natural Products by Mass Spectrometry, Holden-Day, Inc., San Francisco London Amsterdam (1964)
- 96) DAVIS, J.B., JEWERS, K., MANCHANDA, A.H. und WOOD, A.B., Chem. Ind. (London) 627 (1970)
- 97) SOTI, F., Tetrahydron Lett. 16, 1437 (1967)
- 98) JANOT, M.-M., TRUONG-HO, M., KHUONG-HUU, Q. und GOUTAREL, R., Bull. Soc. Chim. Fr. 1963 (1977)
- 99) HESSE, M., MEIER, H. und ZEEH, B., Spektroskopische Methoden in der organischen Chemie, 2. Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart (1984)
- 100) TSCHESCHE, R., MÖRNER, J. und SNATZKE, G., Liebigs Ann. Chem. 670, 103 (1963)
- 101) KARPLUS, M., J. Chem. Phys. 30, 11 (1959)
- 102) BHACCA, N.S. und WILLIAMS, D.H., Application of NMR Spectroscopy in Organic Chemistry, Holden-Day, Inc., San Francisco London Amsterdam (1964)

- 103) PRETSCH, F., CLERC, T., SEIBL, J. und SIMON, W., Tabellen zur Strukturaufklärung organischer Verbindungen mit spektroskopischen Methoden, Springer Verlag, Berlin Heidelberg New York (1976)
- 104) SMITH, L.L., Steroids 4, 395 (1964)
- 105) SHOOLERY, J.N. und RODGERS, M.T., J. Am. Chem. Soc. 80, 5121 (1958)
- 106) ZÜRCHER, R.F., Helv. Chim. Acta 44, 1380 (1961)
- 107) EINHORN, J., MONNERET, C. und KHUONG-HUU, Q., Phytochemistry 11, 769 (1972)
- 108) KAGAN, H.B., Stereochemistry, Bd. 1, Determination of Configurations by Spectrometric Methods, Georg Thieme Publishers, Stuttgart (1977)
- 109) WILLIAMS, D.H. und FLEMING, J., Strukturaufklärung in der organischen Chemie, 5. Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart New York (1985)
- 110) CIFONELLI, J.A. und SMITH, F., Anal. Chem. 26, 1132 (1954)
- 111) YOSIOKA, J., NISHIMURA, T., MATSUDA, A. und KITAGAWA, L., Chem. Pharm. Bull. 18, 1610 (1970)
- 112) MANSKE, R.H.F., The Alkaloids, Bd. 7, Academic Press, New York San Francisco London (1960)
- 113) ANET, F.A.L., Chem. Ind. (London) 81 (1963)
- 114) RAPOPORT, H. und BORDNER, J., J. Org. Chem. 29, 2727 (1964)
- 115) VELLUZ, L. und LEGRAND, M., Angew. Chem. 73, 603 (1961)
- 116) KHUONG-HUU, Q., YASSI, J. und GOUTAREL, R., Bull. Soc. Chim. Fr. 2486 (1963)
- 117) JANOT, M.-M., KHUONG-HUU, Q., YASSI, J. und GOUTAREL, R., Bull. Soc. Chim. Fr. 787 (1964)
- 118) LORA-TAMAYO, M., MANDRONERO, R. und MUNOZ, G.G., Chem. Ber. 93, 289 (1960)
- 119) GRIBBLE, G.W. und HOFFMANN, J.H., Synthesis 859 (1977)
- 120) ODENTHAL, K.P., Fa. Madaus, Private Mitteilung
- 121) VANDE CASTEELE, K., DE POOTER, H. und VAN SUMERE, C.F., J. of Chromatogr. 121, 49 (1976)

Die vorliegende Arbeit entstand unter Leitung von Herrn Professor Dr. H. Wagner am Institut für Pharmazeutische Biologie der Universität München.

Für die Unterstützung bei der Durchführung meiner Arbeit möchte ich ganz besonders danken:

Herrn Prof. Dr. H. Wagner für das große Interesse an dieser Arbeit und deren stets großzügige Förderung.

Herrn Prof. Dr. J. Sonnenbichler und Mitarbeitern, Max-Planck - Institut Martinsried, für die Aufnahme aller 500 MHz ^1H -NMR-Spektren und die wertvollen Diskussionsbeiträge.

Herrn Prof. Dr. H. Scheer, Botanisches Institut der Universität München, für die schnelle und freundliche Durchführung der CD-Messungen.

Herrn Dr. O. Seligmann und Frau S. Meier, Institut für Pharmazeutische Biologie der Universität München, für die freundliche Durchführung der chemisch-physikalischen Untersuchungen.

Herrn Dr. H. Koller, Dörner - Institut München, für die schnelle Durchführung der GC/MS-Analysen.

Herrn Priv.-Doz. Dr. Wrackmeyer, Institut für Anorganische Chemie der Universität München, für die Aufnahme des 200 MHz ^1H -NMR-Spektrums.

Herrn Prof. Dr. E. Reimann, Institut für Pharmazeutische Chemie der Universität München, für die wertvollen Anregungen bei den Synthese-Arbeiten.

Herrn Dr. K.P. Odenthal, Fa. Madaus, Köln, für die Durchführung der pharmakologischen Untersuchungen.

Herrn Prof. M.P. Gupta, Laboratorio Especializados de Analisis, Universidad de Panama, und Herrn Dr. M. Ilyas, Dept. of Pharmaceutical and Medicinal Chemistry, Ahmadu Bello University, Zaria, Nigeria, für die freundliche Überlassung von Drogenmaterial. Herrn Prof. S. Siddiqui, Dept. of Chemistry, University of Karachi, für die Überlassung von Conessin-Vergleichssubstanz.

Darüberhinaus möchte ich ganz herzlich den vielen nicht genannten Kolleginnen und Kollegen danken, die auf verschiedenste Weise zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

L E B E N S L A U F

Karin S E E G E R T

geboren am 12. 6 . 1957 in Illertissen

Eltern: Willi Seegert, Postbeamter
Pia Seegert, geb. Hörmann,
AOK-Angestellte

Schulbildung: 1963 - 1967 Volksschule Illertissen
1967 - 1976 Gymnasium Neu-Ulm
Abitur im Juni 1976

Studium der Pharmazie: WS 1976/77 - WS 1979/80 an der
Ludwig-Maximilian-Universität
München

2. Prüfungsabschnitt
der Pharm. Prüfung: Mai 1980

Pharmaziepraktikum: Mai 1980 - April 1981 in der
Gisela Apotheke, München

Approbation: 8. Juli 1981

Öffentliche Apotheke: Oktober 1981 - August 1982 in der
Flora Apotheke, München

Wissenschaftliche
Tätigkeit: 1. September 1982 Beginn der vor-
liegenden Arbeit unter Leitung von
Herrn Prof. Dr. H. Wagner am
Institut für Pharmazeutische Biolo-
gie der Universität München

